



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

CRISTHYANE COSTA DE AQUINO

**ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T, NK E NKT NA LÂMINA
PRÓPRIA NO PICO DA INFLAMAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA
POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS C57BL6/J**

FORTALEZA
2016

CRISTHYANE COSTA DE AQUINO

**ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T, NK E NKT NA LÂMINA
PRÓPRIA NO PICO DA INFLAMAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA
POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS C57BL6/J**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade Federal do Ceará,
como exigência parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Biomedicina

Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças
imunoinflamatórias

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

FORTALEZA
2016

CRISTHYANE COSTA DE AQUINO

**ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T, NK E NKT NA LÂMINA
PRÓPRIA NO PICO DA INFLAMAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA
POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS C57BL6/J**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade Federal do Ceará,
como exigência parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. Carlos Campos Câmara
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA

FORTALEZA
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C871e Costa de Aquino, Cristhyane.
ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T, NK E NKT NA LÂMINA PRÓPRIA NO PICO DA INFLAMAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS C57BL/6J / Cristhyane Costa de Aquino. – 2016.
95 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.
1. 5-fluorouracil. 2. Mucosite intestinal. 3. Mucosa intestinal. 4. Populações linfocitárias. I. Título.
CDD 610
-

“Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes.”

Paulo Freire

RESUMO

O câncer é uma doença que se origina através de alterações genômicas, provavelmente causadas durante um processo sistemático de lesão celular e reparo. O 5-fluorouracil (5-FU) é um dos anti-neoplásicos mais utilizados no tratamento do câncer, exercendo múltiplos efeitos sobre o crescimento celular anormal. Os efeitos colaterais provenientes do 5-FU acometem principalmente tecidos de proliferação rápida, causando mucosite, anorexia, náuseas, vômitos e diarreia. As células *Natural Killer* (NK), da imunidade inata, as células T, da imunidade adquirida, e as células *Natural Killer* (NKT), que podem desempenhar ações imunomodulatórias e estão presentes principalmente na mucosa do intestino. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar as populações de linfócitos NK, T e NKT na lâmina própria de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Utilizamos camundongos machos com 19 a 25g, sendo desafiados com injeção intraperitoneal (dose única) de 5-FU (n=6) ou salina (n=6) (150mg/kg), sendo eutanasiados após 72h. Foi coletado o intestino delgado para processamento histológico para análise morfológica e ensaio de mieloperoxidase. Foi realizado também a extração de linfócitos da lâmina própria do intestino delgado dos animais para análise por citometria de fluxo e coletado sangue do plexo retroorbital para leucometria. Os animais foram pesados diariamente, antes da administração do 5-FU até o dia da eutanásia. O desafio com o 5-FU (150 mg/kg, dose única, via i.p) causou uma redução de peso nos animais, do número de leucócitos no sangue e na altura dos vilos. Aumentou a profundidade das criptas e diminuiu a razão vilo/cripta. Os dados da citometria de fluxo evidenciaram que os animais do grupo 5-FU tiveram uma redução da frequência de células NK (CD16⁺) e de células CD3⁺CD4⁺, nesse mesmo grupo houve um aumento da frequência de células NKT (CD16⁺) e de células CD3⁺CD8⁺. A partir dos nossos achados, concluímos que são necessários estudos mais aprofundados sobre os mecanismos que levaram às alterações nas frequências das diferentes populações linfocitárias investigadas na lâmina própria sobre os efeitos imunoinflamatórios do 5-FU.

Palavras-chaves: 5-fluorouracil. Mucosite intestinal. Mucosa intestinal. Populações linfocitárias.

ABSTRACT

Cancer is a disease that originates through genomic alterations, probably caused during a systematic process of cell injury and repair. 5-fluorouracil (5-FU) is one of the most used anti-neoplastic treatment of cancer exerting multiple effects on abnormal cell growth. Side effects from the 5-FU mainly affect rapidly proliferating tissues, causing mucositis, anorexia, nausea, vomiting and diarrhea. Cells Natural Killer (NK) cells originate from bone marrow, from the common lymphoid progenitor and are part of the innate immune system. The Natural Killer T cells (NKT) are a distinct group of T cells, in general these cells represent less than 1% of the population of T lymphocytes in human peripheral blood and have distinct functions of conventional T lymphocytes. The objective of this study was to identify and characterize subpopulations of lymphocytes NK, NKT, and T in the lamina propria of mice with intestinal mucositis induced by 5-FU. We use male mice with 19 to 25g, being challenged by intraperitoneal injeção (single dose) of 5FU (n = 6) or saline (n = 6) (150mg / kg) and euthanized after 72h. The small intestine was collected for histological processing for morphometric analysis and testing of myeloperoxidase (MPO). It was also performed the lamina propria lymphocyte extraction of the small intestine of animals for flow cytometry and blood collected from the retroorbital plexus leukocyte. The animals were weighed daily prior to administration of 5-FU until the day of euthanasia. The challenge with 5-FU (150 mg / kg, single dose via i.p.) caused a reduction of weight of the animals, the number of leukocytes in blood and villous height. Increased crypt depth ratio and decreased the villus / crypt. The data of flow cytometry showed that the animals of the 5-FU group had a reduction in the percentage of NK cells (CD16 +) and CD3 + CD4 + cells in the same group there was an increased percentage of NKT cells (CD16 +) and cells CD3 + CD8 +. From our findings, we conclude that further studies are needed on the signal lymphocytes in the lamina propria on Immunoinflammatory effects of 5-FU.

Keywords: 5-fluorouracil. Intestinal mucositis. Intestinal mucosa. Lymphocyte populations

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu orientador, **Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá**, pelo acolhimento que recebi ao entrar no LABICONTE, estando sempre presente em todos os momentos, orientando com excelência e ética na execução deste trabalho. Pelas oportunidades que me proporcionou e pela confiança depositada em mim. Meu eterno agradecimento.

À ajuda fundamental da **Profa. Dra. Lilia Câmara**, sem o seu apoio esse trabalho não teria sido concluído. Muito obrigada pelos ensinamentos, puxões de orelha e por ficar várias vezes até mais tarde no laboratório me ajudando. Obrigada também **Prof Luís**, que com sua calma e paciência fazia tudo ser mais leve. Obrigada pelos PFA's, FACS e na ajuda com a CPU até o Departamento de Patologia.

À amiga **Camila Fernandes**, muito obrigada pela ajuda nos experimentos de extração de linfócitos e com a Citometria de Fluxo. Trabalhar esses dois com você foi muito prazeroso e inspirador, sem a sua ajuda tudo seria bem mais difícil. Não existem palavras para expressar a gratidão pela amizade e ajuda disponibilizada durante esses dois anos.

Ao amigo **Carlos Campos Câmara**, muito obrigada pela ajuda com o transporte das amostras da UNIFOR pra UFC, pelas palavras de incentivo e companheirismo. Você foi um amigo verdadeiro que conquistei nesse mestrado.

Aos amigos da pós-graduação, membros e ex-membros do LABICONTE: **Antonionne Moara, Camilla Almeida, Celina Viana, Davi Gonçalves, Italo Leite, Josiane Santos, Juliana Rêgo, Juliana Zani, Kildere Canuto, Leonardo Lobo, Luís Antônio, Patricia Teles, Raul Freitas, Theídes Carneiro e Tiê Costa**. Agradeço a amizade e solidariedade que foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Muito bom contar com essa equipe.

Aos alunos e ex-alunos da iniciação científica: **Amanda Ribeiro, Carolina Benício, Daniel Moreira, Dulce Maria, Jardlon Costa, Juliana Mara, Luciana Vasconcelos, Mayara Vasconcelos, Naftanael Ricarte, Priscila Briseno e Vicente Souza**. Tenho profunda admiração por vocês, mesmo com tantas atividades curriculares, sempre estavam dispostos a ajudar. Meu reconhecimento e gratidão.

Aos amigos do apoio técnico do LABICONTE: **Ricardo Teixeira, Rosângela Teixeira, Michelle Vieira e Gleyde Anny**. Agradeço pela dedicação, comprometimento e profissionalismo essenciais para a rotina do laboratório.

Aos amigos conquistados na UFC: **Amanda Aragão, Priscila Caracas, Sarah S'antanna, Mara Prata, Thiago, Alceu, Deiziane, Lucas Carvalho, Tanila** e tantos outros por fazerem parte dessa etapa da minha vida.

Aos professores: **Dr. Ronaldo Ribeiro** (*in memoriam*) e **Dr. Roberto César** por ter aberto as portas do LAFICA para execução de alguns experimentos, pela colaboração e gentilmente ter cedido o quimioterápico 5-Fluorouracil. Á todos os alunos e

funcionários deste laboratório que me acolheram e me ajudaram com muito carinho. Minha eterna admiração e gratidão.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, aos seus professores, meu agradecimento pelos conhecimentos obtidos durante este trajeto.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: **Ivone e Rita**, muito obrigada pela disponibilidade, desde o dia da matrícula até hoje vocês sempre fizeram o possível e o impossível para ajudar. Agradecer é o mínimo que posso fazer para retribuir a ajuda durante esses dois anos.

Ao Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro (**IBISAB**) por financiar e apoiar parte desse projeto e aos seus funcionários: **Kátia, Charles, José, Risnaldo, Cláudia, Valdenir, Terezinha, Luciana e Charlienne**. A rotina de trabalho fica muito mais alegre com a presença e o sorriso de vocês. Sempre pude contar com palavras positivas e o incentivo diário. Obrigada por estarem sempre torcendo para que esse trabalho fosse concluído.

À **Universidade de Fortaleza**, em especial ao professor **Ramon Raposo** (e sua equipe), obrigada por essa colaboração tão importante na condução deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, por financiar e prestar apoio a este projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por me acompanhar todos os dias e me permitir vencer mais essa etapa. Sem o Senhor nada poderia ter feito. E a intercessão de Nossa Senhora sempre tão presente em minha vida, seja nos momentos de glória como nos momentos de luta.

À minha **mãe**, meu exemplo de vida, de garra, de superação. Não sei o que seria de mim sem o seu apoio incondicional e seu incentivo. Essa conquista é sua, foi por você toda minha dedicação. Minha gratidão eterna.

À minha família: **irmã, pai, tias, primas**, não tem preço os momentos que estamos juntos, a melhor companhia sempre é a da família.

Às minhas amigas **Malu, Samara, Rosa, Deuzilane e Jana**, pela amizade, conversas e momentos de descontração (que quase sempre envolviam viagens, e sempre as melhores no nosso refúgio preferido, Noronha, sempre tão mágica e inspiradora) que tornaram mais fácil a realização deste trabalho.

Às amigas da graduação: **Ariella, Cássia, Jordana, Lara, Lilian, Rayssa, Raquel e Sara** pelo apoio, conversas, risadas por sempre estarem dispostas a ceder um ombro amigo nos momentos de alegria e desafios.

À amiga do coração **Patrícia Azevedo**, sempre tão doce e incentivadora, suas palavras sempre me fizeram seguir em frente e acreditar no meu potencial. Minha admiração por você só aumenta.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU - 5-fluorouracil

APCs - Célula apresentadora de antígeno

APC - Aloficocianina

DC - Células dendríticas

DPD - Diidropirimidina desidrogenase

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

FACS - Separação celular utilizando reagentes fluorescentes (*Fluorescence-activated cell sorting*)

FDUMP - 5-fluoro-2'-desoxiuridina

FUDP - Difosfato de fluorouridina

FUTP - Trifosfato de fluorouridina

FUMP - Monofosfato de fluorouridina

FITC - Isoticianato de fluoresceína

GALT – Tecido linfoide associado ao intestino

IgA - Imunoglobulina A

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IEL – Linfócitos intraepiteliais

IL - Interleucina

IFN- γ - Interferon-gamma

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC-II – Complexo principal de histocompatibilidade II

NK – Célula assassina natural

NKT – Célula T assassina natural

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Tampão fosfato salina

PE - Ficoeritrina

PercP - Proteína clorofilperidina

PP - Placas de Peyer

rpm - Rotações por minuto

RPMI - Meio de cultura para células

TCR- Receptor de célula T

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

TGI - Trato gastrointestinal

Th1 – Célula T auxiliar tipo 1

Th2 – Célula T auxiliar tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TLRs – Receptor tipo Toll

TPP - Trifenilfostina

UFC - Universidade Federal do Ceará

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do 5-fluorouracil.....	21
Figura 2. Fases da mucosite intestinal.....	24
Figura 3. Componentes do sistema imune da mucosa.....	29
Figura 4. Expressão dos diferentes marcadores de células NKs de camundongos e humanos, conforme o processo de diferenciação.....	33
Figura 5. Papel das células NKT na inflamação intestinal.....	40
Figura 6. Administração intraperitoneal de 5-FU em camundongos.....	45
Figura 7. Modelo esquemático da análise morfométrica da altura do vilô e da profundidade da cripta (A e B) utilizando o programa <i>Image J 1.4</i> [®] (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).....	47
Figura 8. Demonstração da contagem de células viáveis usando azul de tripan na câmara de Neubauer.	49
Figura 9. Estratégia de seleção das subpopulações linfocitárias.....	50
Figura 10. Histograma.....	51
Figura 11. Efeito da administração do 5-fluorouracil sobre o peso corporal de camundongos C57BL/6J.....	53
Figura 12. Efeito da administração do 5-fluorouracil sobre a leucometria de camundongos C57BL/6J.....	54
Figura 13. Histologia representativa do intestino proximal de camundongos C57BL6J	

após a indução de mucosite intestinal pelo 5-FU (150mg/kg) via intraperitoneal, corados com HE.....	55
Figura 14. Histologia representativa do intestino proximal de camundongos C57BL6J após a indução de mucosite intestinal pelo 5-FU (150mg/kg) via intraperitoneal, corados com HE.....	56
Figura 15. Avaliação morfométrica da altura dos vilos no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos desafiados pelo 5-FU.....	57
Figura 16. Avaliação morfométrica da profundidade das criptas no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos desafiados pelo 5-FU.....	58
Figura 17. Avaliação morfométrica da razão vilo/cripta no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos desafiados pelo 5-FU.....	59
Figura 18. Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno, jejuno e íleo três dias após o tratamento com salina ou 5-FU. Animais tratados com 150mg/kg de peso de solução salina ou 5-FU por via intraperitoneal.....	60
Figura 19. Percentagem de células NK no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.....	61
Figura 20. Percentagem de células NK CD16+ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.....	62
Figura 21: Percentagem de células NK CD16- no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.....	63
Figura 22. Percentagem de células NKT no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.....	64
Figura 23. Percentagem de células NKT CD16+ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.....	65

Figura 24. Percentagem de células NKT CD16- no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.....	66
Figura 25. Percentagem de células CD3+CD4+ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.....	67
Figura 26. Percentagem de células CD3+CD8+ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.....	68
Figura 27. Análise da razão do percentual de células TCD4/TCD8 no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	69
Figura 28. Percentagem de células CD45+CD11a+CD11b+ no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Câncer.....	18
1.1.2 5-fluorouracil.....	20
1.1.3 Mecanismo de ação do 5-fluorouracil	21
1.1.4 Toxicidade.....	22
1.2 Mucosite intestinal.....	23
1.3 Imunidade da mucosa intestinal.....	25
1.4 Células Natural Killer e seu papel no sistema imune da mucosa intestinal.....	31
1.4.1 Origem das células NKs	31
1.4.2 Função das células NKs	31
1.4.3 Fenótipo das células NKs em murinos e humanos.....	32
1.4.4 Papel das células NKs na mucosa intestinal.....	34
1.5 Células T Natural Killer (NKT).....	34
1.5.1 Origem das células T Natural Killer (NKT).....	34
1.5.2 Tipos de células NKT.....	35
1.5.3 Subpopulações das células NKT.....	37
1.5.4 Funções das células NKT.....	38
1.5.5 Frequência das células NKT.....	38
1.5.6 Células NKT e seu papel na mucosa intestinal.....	39
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 Geral.....	42

2.2 Específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 Animais.....	43
3.2 Equipamentos e Materiais.....	43
3.3 Drogas e Reagentes.....	44
3.4 Indução da mucosite intestinal pelo tratamento do 5-FU.....	45
3.5 Análise ponderal.....	45
3.6 Leucometria.....	45
3.7 Análise morfométrica.....	46
3.8 Ensaio da mieloperoxidase (MPO).....	47
3.9 Avaliação da população de linfócitos no intestino proximal por Citometria de fluxo.....	48
3.10 Estratégia de seleção das subpopulações linfocitárias.....	50
3.11 Análise Estatística.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Análise ponderal.....	53
4.2 Leucometria.....	54
4.3 Avaliação das alterações histológicas na mucosite intestinal nos animais desafiados com 5-FU (150 mg/kg) e tratados com salina.....	55
4.4 Avaliação das alterações histológicas na mucosite intestinal nos animais desafiados com 5-FU (150 mg/kg) e tratados com salina.....	56
4.5 Avaliação morfométrica da altura dos vilos nos animais desafiados com 5-FU (150mg/kg) e tratados com salina.....	57

4.6 Avaliação morfológica da profundidade das criptas nos animais desafiados com 5-FU (150mg/kg) e tratados com salina.....	58
4.7 Avaliação morfológica da razão vilo/cripta nos animais desafiados com 5-FU (150mg/kg) e tratados com salina.....	59
4.8 Atividade de MPO.....	60
4.9 Avaliação do parâmetro percentagem de células NK no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	61
4.10 Avaliação do parâmetro percentagem de células NK CD16+ no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	62
4.11 Avaliação do parâmetro percentagem de células NK CD16- no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	63
4.12 Avaliação do parâmetro percentagem de células NKT no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	64
4.13 Avaliação do parâmetro percentagem de células NKT CD16+ no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	65
4.14 Avaliação do parâmetro percentagem de células NKT CD16- no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	66
4.15 Avaliação do parâmetro percentagem de células CD3+CD4+ no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	67
4.16 Avaliação do parâmetro percentagem de células CD3+CD8+ no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	68
4.17 Análise da razão do percentual de células TCD4/TCD8 no intestino delgado de camundongos C57BL6J tratados com salina e 5-FU.....	69

4.18 Avaliação da frequência de células CD45+CD11a+CD11b+ no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.....	70
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÃO.....	77
7. REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença que se origina através de alterações genômicas, provavelmente causadas durante um processo sistemático de lesão celular e reparo (AKATSUKA *et al.*, 2012). Possui etiologia multifatorial e pode surgir a partir de todos os tipos celulares e órgãos (BASKAR; LEE; YEO; YEOH, 2012). As alterações genômicas que ocorrem, podem ser causadas durante um processo contínuo de lesão celular e reparo (AKATSUKA *et al.*, 2012). A transformação de células normais em células cancerígenas é dependente de mudanças na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais, provavelmente através de alterações no número de cópias de DNA demonstrando a instabilidade genômica, que tem sido descrita como um mecanismo que permite a tumorigênese (KLIJN *et al.*, 2008).

A integridade do DNA é garantida pela correta duplicação do genoma seguida da segregação dos cromossomos livres de danos para as células filhas e é crucial para a saúde e longevidade de todos os organismos. Para assegurar a fidelidade desses processos, as células respondem aos danos genéticos pela parada do ciclo celular e induz o reparo do DNA (LEVITT *et al.*, 2007). Outro mecanismo celular que monitora os danos genéticos é a morte celular programada (apoptose). Quando as células apresentam mutações cromossômicas, danos no DNA e outras anomalias celulares, normalmente elas sofrem apoptose impedindo sua proliferação. Defeitos nos mecanismos de apoptose levam à perda da estabilidade genômica das células, ou seja, levam à instabilidade genética, a qual está relacionada com diversos processos patológicos, principalmente a carcinogênese (KLEIN *et al.*, 2006).

Apesar do câncer ser uma patologia conhecida e caracterizada desde século XVIII por Morgagni e Bichat (TEIXEIRA, 2007), somente nas últimas décadas configurou-se como evidente problema de saúde pública mundial, pois a sua prevalência tem aumentado no contexto das doenças crônicas não transmissíveis. São vários fatores que contribuíram para o aumento da incidência de câncer na população, como: processo de urbanização, avanços tecnológicos no setor da saúde, ações de promoção e recuperação da saúde que proporcionam um aumento na expectativa de vida e, também, ao melhor diagnóstico (ROSENFELD *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2010).

Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer podem ser divididos em: agentes alquilantes e compostos correlatos (mostarda nitronenada, ciclofosfamida, bussulfano, ifosfamida) que atuam através da formação de ligações covalentes com o DNA, mais especificamente com as bases guaninas, impedindo dessa forma a sua replicação; derivados vegetais (alcaloides da vinca, taxanos, etoposida, camptotecinas), que afetam especificamente a função dos microtúbulos e, por conseguinte, a formação do fuso mitótico, levando a aneuploidia; antibióticos citotóxicos (antraciclinas, dactinomicina, bleomicinas) que são substâncias de origem microbiana que impedem a divisão das células dos mamíferos; os antimitóticos (vincristina, vimblastina, docetaxel, paclitaxel) que interferem na formação do fuso mitótico; inibidores de topoisomerasas (irinotecano, etoposido), que impedem a atividade destas enzimas, impedindo o relaxamento do estresse gerado pela torção do DNA durante a replicação e transcrição e, como consequência, geram quebras no DNA; e antimetabólitos (metotrexato, fludarebina, fluorouracil), que interferem na síntese dos precursores de DNA e RNA e, em alguns casos, por apresentarem estruturas semelhantes aos precursores endógenos dos ácidos nucleicos, podem ser metabolizadas através das rotas púricas e pirimídicas (INCA, 2008; RANG *et al*, 2004).

O desenvolvimento do câncer altera diversos aspectos na vida do paciente. Além de desconforto e dor que comprometem a capacidade de realizar tarefas rotineiras, há também perda de autoestima e modificações de ordem social (PAIVA, 2006), o que levou ao aumento na busca por formas de tratamento antineoplásico mais efetivos e menos agressivos. Os tratamentos disponíveis atualmente incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e, mais recentemente, imunoterapia, com resultados bastante promissores (VERDE, 2007).

A quimioterapia é um tratamento antineoplásico sistêmico, sendo classificada de três maneiras: neoadjuvante, terapêutica e adjuvante. A quimioterapia neoadjuvante é o uso de quimioterapia como tratamento inicial para redução do tumor de pacientes que serão submetidos a tratamento cirúrgico e/ou radioterapia. A terapêutica ocorre quando a única abordagem é a submissão do paciente à quimioterapia. Já a adjuvante é utilizada após o tumor primário ter sido controlado por terapia cirúrgica ou radioterápica (CHUD; DeVITA, 2001; ANELLI, 2002; GIMENEZ, 2003).

As drogas antineoplásicas possuem a função de induzir a morte ou comprometer as células tumorais susceptíveis, bloqueando vias metabólicas ou bioquímicas sensíveis às drogas (LIMA, 2004). Percebe-se que cada quimioterápico tem perfil de toxicidade distinto e os efeitos colaterais têm relação direta com a droga utilizada e o estado clínico do indivíduo (LIMA, 2004; VERDE, 2007). Neste sentido, o 5-Fluorouracil é um dos quimioterápicos que causa importantes efeitos colaterais (LEITÃO *et al.*, 2007). Mielotoxicidade, cistite, toxicidade pulmonar, cardiotoxicidade e mucosite são efeitos adversos mais encontrados após o uso deste agente (BOWEN *et al.*, 2007; VERDE, 2007).

1.1.2 5-Fluorouracil

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um dos antineoplásicos mais utilizados para tratamento do câncer (ANTUNIASSI, 2005), exercendo múltiplos efeitos sobre o crescimento celular anormal. É amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de tumores, como os de cólon, mama, cabeça e pescoço (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O 5-FU é um análogo estrutural da uracila, diferindo apenas pela substituição de um átomo de hidrogênio por um flúor no carbono 5 no anel pirimídico (figura 1) (ZHANG *et al.*, 2008). É classificado como antimetabólito, classe que inclui drogas antineoplásicas com maior espectro de ação na prática oncológica (CHU; DeVITA, 2001; ANELLI, 2002; GIMENEZ, 2003). Os antimetabólitos assemelham-se estruturalmente com o ácido fólico cujas bases são purina e pirimidina, envolvidas na síntese de DNA, RNA e determinadas enzimas. Diferem-se, no entanto, no arranjo molecular do metabólito correspondente, em grau suficiente para atuarem como substratos falsos em reações químicas. Ademais, o 5-FU inibe etapas de síntese ou, incorpora-se em moléculas interferindo na função ou replicação celular (LIMA, 2004).

O fármaco é administrado por via intravenosa, na forma de bolus (administração rápida, em tempo menor ou igual a um minuto) ou como infusão contínua prolongada (tempo superior a sessenta minutos, ininterruptamente) durante determinado período. A meia-vida é curta, de dez a vinte minutos, tornando a infusão contínua vantajosa (LIMA, 2004).

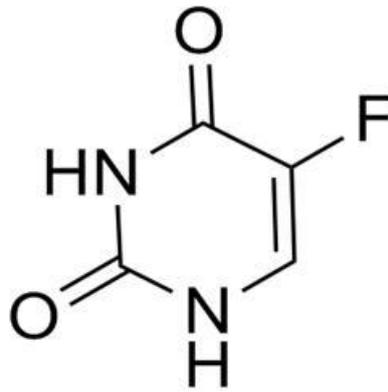


Figura 1: Estrutura química do 5-Fluorouracil. Fonte: PINEDO & PETERS, 1998.

Após a administração, o 5-FU entra rapidamente nas células, por meio do transporte facilitado. A maior parte da droga administrada (80%) é metabolizada no fígado pela ação da enzima dihidropirimidina-desidrogenase (DPD), que converte o 5-FU ao composto dihidrofluorouracil (DHFU), que é excretado pelo organismo através da urina ou pela respiração (SAVVA-BORDALO *et al.*, 2010). Estudos indicam que pacientes com deficiência de DPD apresentam uma grave toxicidade ao 5-FU, em alguns casos o paciente pode chegar a morte (COURSIER *et al.*, 2010). O 5-FU é uma droga específica de fase, que atua na fase G1 e na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese do RNA ou DNA, respectivamente. Para exercer sua ação tóxica, a droga precisa ser ativada metabolicamente, gerando os seguintes compostos citotóxicos *por reações enzimáticas*: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP) (CRAIG, STITZEL, 2005).

1.1.3 Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil

A droga, após conversão intracelular em monofosfato de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FDUMP), atua como potente antimetabólito que se liga à timidilato sintetase, inibindo-a (McCARTHY *et al.*, 1998). Há ainda inibição do ácido timidílico e comprometimento da síntese de DNA e, conseqüentemente, do crescimento celular. O metabolismo do 5-FU produz ainda um intermediário crítico, o trifosfato 5-fluoruridina (FUTP), que se incorpora ao RNA e interfere na função celular. As células com alto índice mitótico são as mais afetadas, e por isso, as da medula óssea e do trato gastrintestinal são muito susceptíveis (JENSEN *et al.*, 2003; ANTUNIASSI, 2005).

1.1.4 Toxicidade

Evidências clínicas indicam que muitos pacientes sofrem com graves efeitos adversos causados pelo 5-FU e muitas vezes são obrigados a interromper o tratamento (BREDA; BARATTE, 2010; CHANG *et al.*, 2012). Os efeitos colaterais provenientes do 5-FU acometem principalmente tecidos de proliferação rápida do trato gastrointestinal, causando mucosite, anorexia, náuseas, vômitos e diarreia. Essas complicações variam de acordo com a dose, o esquema posológico adotado, a via de administração e o estado geral do paciente (VERDE, 2007; SONIS *et al.*, 2004). Mielossupressão também pode ocorrer, sendo mais comum na administração em *bolus*. (GREM, 2000; VERDE, 2007).

Aproximadamente 40% dos pacientes tratados com 5-FU apresentam mucosite, podendo chegar a 100% com o uso de altas doses. Isso contribui para a interrupção do tratamento, necessidade de modificação do esquema de administração da droga, mudança na seleção do quimioterápico ou redução das doses, comprometendo a eficácia da terapia proposta e refletindo na saúde e qualidade de vida do paciente (BOWEN *et al.*, 2007; STRIGER *et al.*, 2009; VLIET *et al.*, 2010). Devido a esses fatores, torna-se importante entender a mucosite intestinal.

1.2 Mucosite intestinal

A mucosa do trato gastrintestinal, devido à alta taxa proliferativa, é particularmente susceptível a complicações. Por conseguinte, os indivíduos submetidos a quimioterapia, cujos tumores podem ou não ser originários do trato alimentar são considerados grupo de risco para tal evento (LIMA, 2004).

Mucosite do trato alimentar é o termo clínico usado para descrever as alterações provocadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o trato alimentar de maneira global ou localizada (cavidade oral – mucosite oral – ou mucosa intestinal – mucosite gastrintestinal). A alta prevalência de manifestações clínicas adversas como disfagia, dispepsia, diarreia, náuseas e vômitos, dor abdominal, úlceras orais e anorretais, entre outras, são resultado da pouca seletividade dos agentes antineoplásicos e da alta taxa de proliferação do epitélio do trato gastrintestinal (GIBSON; KEEFE, 2006). Qualquer região da mucosa digestiva (desde a boca ao ânus) pode ser afetada, e por esta razão, o termo mucosite alimentar, mais abrangente, tem sido considerado o mais adequado para descrever o processo (SONIS, 2004; SCULLY; SONIS, 2006).

Segundo Hauer-Jensen *et al.* (2004), a mucosite acomete principalmente o intestino delgado. Logan *et al.* (2009) observaram alterações mínimas no cólon após administração dos quimioterápicos metotrexato (MTX) ou 5-FU. Já Ferreira *et al.* (2012) não encontraram alterações no cólon com o uso do 5-FU.

A diarreia, o sintoma mais marcante na mucosite intestinal, é observada em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando se observa diarreia de grau 3-4 (> 7 episódios de diarreia por dia havendo a necessidade de hidratação por um período superior a 24h) em até 25% dos pacientes (KEEFE *et al.*, 2007). Dos pacientes que apresentam mucosite, 35% sofrerão um atraso nos ciclos subsequentes de quimioterapia, 60% irão requerer redução nas doses aplicadas e 30% a descontinuação do regime de tratamento. A mucosite é ainda associada a febre, aumento do risco de infecção, interrupção do tratamento e aumento dos custos hospitalares (LIMA, 2004; ANTUNIASSI, 2005). Além disso, em pacientes neutropênicos, em consequência da quimioterapia, a presença de mucosite representa um aumento de quatro vezes no risco de sepse (RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

O reflexo desses dados envolve o aumento da morbidade e mortalidade de pacientes com câncer. Sabe-se que as alterações que ocorrem na mucosa, em geral, resultam em decréscimo da ingestão oral, acarretando deficiências nutricionais (McCARTHY *et al.*, 1998; SANTOS, 2009), além de negativamente afetarem a qualidade de vida desses pacientes (LALLA *et al.*, 2006).

Sonis (2004) descreve o desenvolvimento da mucosite em cinco fases, que ocorrem dinamicamente: iniciação, reposta a danos primários, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização (Figura 2).

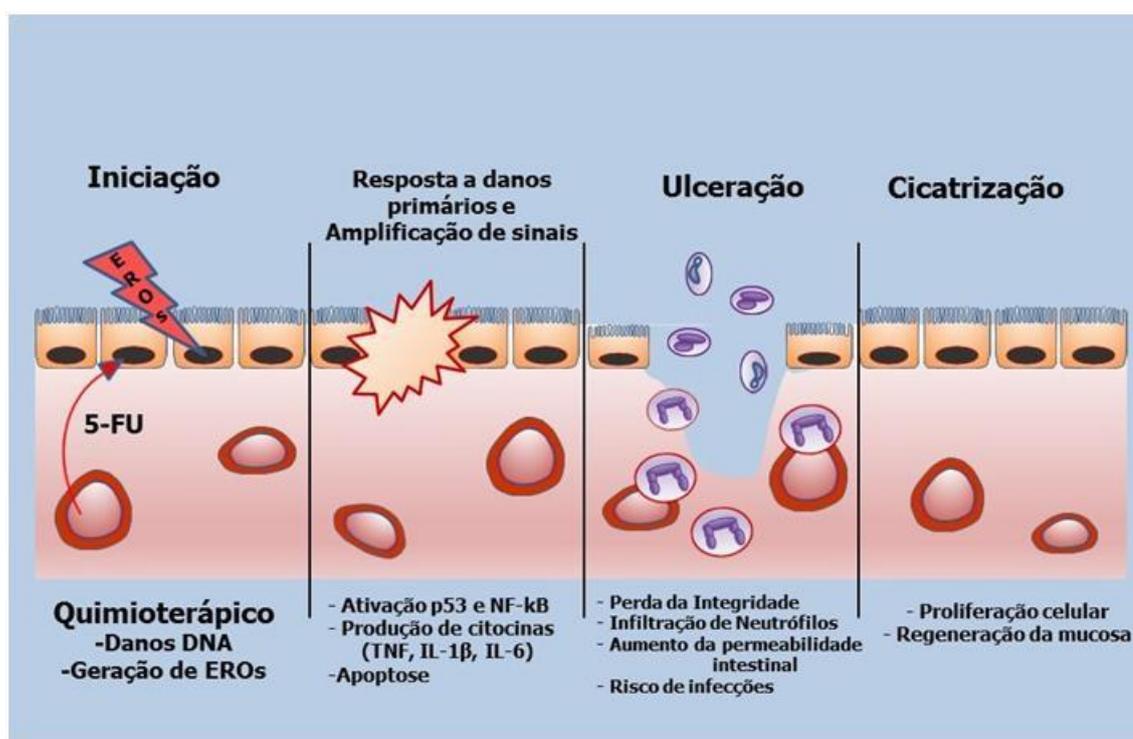


Figura 2: Fases da mucosite intestinal. Fonte: Adaptado de Sonis, 2004.

O exato mecanismo biológico da mucosite induzida pela quimioterapia ainda não está totalmente esclarecido (GIBSON, 2006; KEEFE *et al.*, 2007). Acredita-se que sua gênese esteja relacionada ao efeito apoptótico das drogas sobre as células intestinais (WU, Z. *et al.*, 2011). Além disso, a ação da microbiota intestinal também tem sido investigada, onde variações nessa microbiota podem influenciar no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos (VON BULTZINGSLOWEN *et al.*, 2003). De fato, a

administração de probióticos reduz a inflamação e a disfunção do trato gastrointestinal na mucosite induzida por 5-FU em murinos (JUSTINO *et al.*, 2014).

O envolvimento de mediadores inflamatórios como IL-1 e TNF- α na patogênese na mucosite intestinal causada pelo 5-FU foi demonstrado por vários autores (SONG *et al.*, 2013; JUSTINO *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2011). A lesão intestinal relacionada ao 5-FU, leva à ativação de mediadores inflamatórios, como fator ativador de plaquetas (PAF) (SOARES *et al.*, 2011) e IL-1 (SOARES, 2008). Adicionalmente, Wu *et al.* (2011), demonstraram que o uso do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) foi capaz de diminuir a apoptose nas criptas jejunais, de atenuar as alterações histopatológicas e de reduzir a gravidade da diarreia, em camundongos.

Apesar do papel desses mediadores inflamatórios ter sido claramente elucidado, o envolvimento de células do sistema imune inato e adaptativo no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por 5-FU ainda não foi demonstrado, embora se saiba do relevante papel dessas células na imunidade da mucosa intestinal, no controle de infecções e da inflamação e na regeneração tecidual.

1.3 Imunidade da Mucosa Intestinal

Aproximadamente 10^{14} microrganismos residem no lúmen intestinal contribuindo e auxiliando no metabolismo de nutrientes, integridade do epitélio assim como no equilíbrio da imunidade local (KURASHIMA *et al.*, 2013). Esses benefícios causados pela microbiota intestinal sugerem que a coevolução permitiu selecionar mecanismos que promovem e mantêm a associação entre bactérias e eucariontes (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010).

Na mucosa do trato gastrointestinal existe uma regulação negativa cujo objetivo é não reconhecer antígenos do próprio hospedeiro ou aqueles não lesivos originários da alimentação e da microbiota. Este mecanismo de tolerância é mediado pela regulação dos linfócitos T e pela detecção precoce de agentes invasores pelas células epiteliais. (SARTOS, 2002).

O epitélio do intestino delgado está continuamente em contato com os antígenos dos alimentos, bactérias entéricas comensais e patógenos potenciais que entram em contato

com o hospedeiro através da dieta. A carga bacteriana do intestino delgado é baixa e aumenta distalmente (SANTAOLALLA; FUKATA; ABREU, 2011). O epitélio intestinal é composto primariamente por enterócitos que são conectados por junções firmes (zônula de oclusão) para formar uma barreira impermeável entre o corpo e o conteúdo luminal. Estas células são responsáveis por importar nutrientes do lúmen e liberar IgA dentro dele, como também participam ativamente da imunidade por produzir peptídeos antimicrobianos e citocinas pró-inflamatórias em resposta à ativação de receptores de reconhecimento de padrão pelos microorganismos patogênicos (PRR = pattern recognition receptor ou receptor que reconhece padrão) (ARTIS, 2008).

O sistema linfático do intestino também está ligado a uma função absorptiva, formando o que chama de ALPA (*apparatus lymphaticus periphericus absorvens*), associada às funções dos outros tecidos que compõem o intestino, tais como: absorver nutrientes e transportá-los, realizar trocas iônicas e de eletrólitos, produzir hormônios, possuir receptores para hormônios; além disso possui um contato íntimo com o meio externo através de uma barreira epitelial. A barreira é estabelecida pelas células epiteliais e as células dendríticas que participam tanto do sistema imune inato como do adaptativo (SANSONETTI, 2004).

As células epiteliais formam uma importante barreira físico-química que limitam o crescimento microbiano e o acesso à superfície do intestino. O epitélio intestinal pode reconhecer produtos microbianos através de sensores como TLR (*Toll-like receptor*) que detectam bactérias, fungos, vírus e protozoários; NLRs (*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*), responsáveis por reconhecerem produtos bacterianos, e por fim os RLRs (*RIG-I-like receptor*), os quais reconhecem componentes virais (MACIA *et al.*, 2012). Esses componentes do sistema imune contribuem para a integridade e regeneração do epitélio sob constante exposição aos antígenos microbianos, mantendo uma barreira mucosa saudável.

A barreira é apenas parcial, pois na verdade muitos microorganismos podem ultrapassá-la e entrar em contato via células epiteliais com as células da lâmina própria da mucosa intestinal. A maioria dos que cruzam, são agentes não patogênicos e entre muitas funções podem modular a resposta imune. (SANSONETTI, 2004).

O sistema imune da mucosa intestinal é composto principalmente por células epiteliais, células dendríticas (DCs), células *natural killers* (NK), linfócitos (intraepiteliais-IEL e da lâmina própria – LP), células M, além de tecidos linfoides organizados como: placas de Peyer (PP), folículos linfoides isolados e linfonodos mesentéricos (LNMs), conforme a figura 3.

No epitélio intestinal existe uma monocamada celular que contém células M, células caliciformes, células de Paneth, células epiteliais colunares, as quais têm papel fundamental na manutenção da homeostase local. Essa monocamada celular forma uma barreira conectada com sofisticadas junções celulares, como a junção de oclusão, claudina-1 e zônula de oclusão 1 (NIESS *et al.*, 2005).

As células de Paneth e as células caliciformes contribuem para a defesa na imunidade inata com o suporte na função da barreira epitelial (SALZMAN, 2011). Essas células são responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos e mucinas, respectivamente, e ainda auxiliam na transcitose de IgA pelo epitélio colunar (KUROSHIMA *et al.*, 2013). O muco, produzido pelas células caliciformes, bloqueia a adesão direta de bactérias comensais ao epitélio. Foi observado, que camundongos deficientes na produção de mucina 2, as bactérias são capazes de alterar a morfologia de células epiteliais e através deste contato direto levam ao desenvolvimento espontâneo de colite e câncer de colo (VAN DER SLUIS *et al.*, 2006).

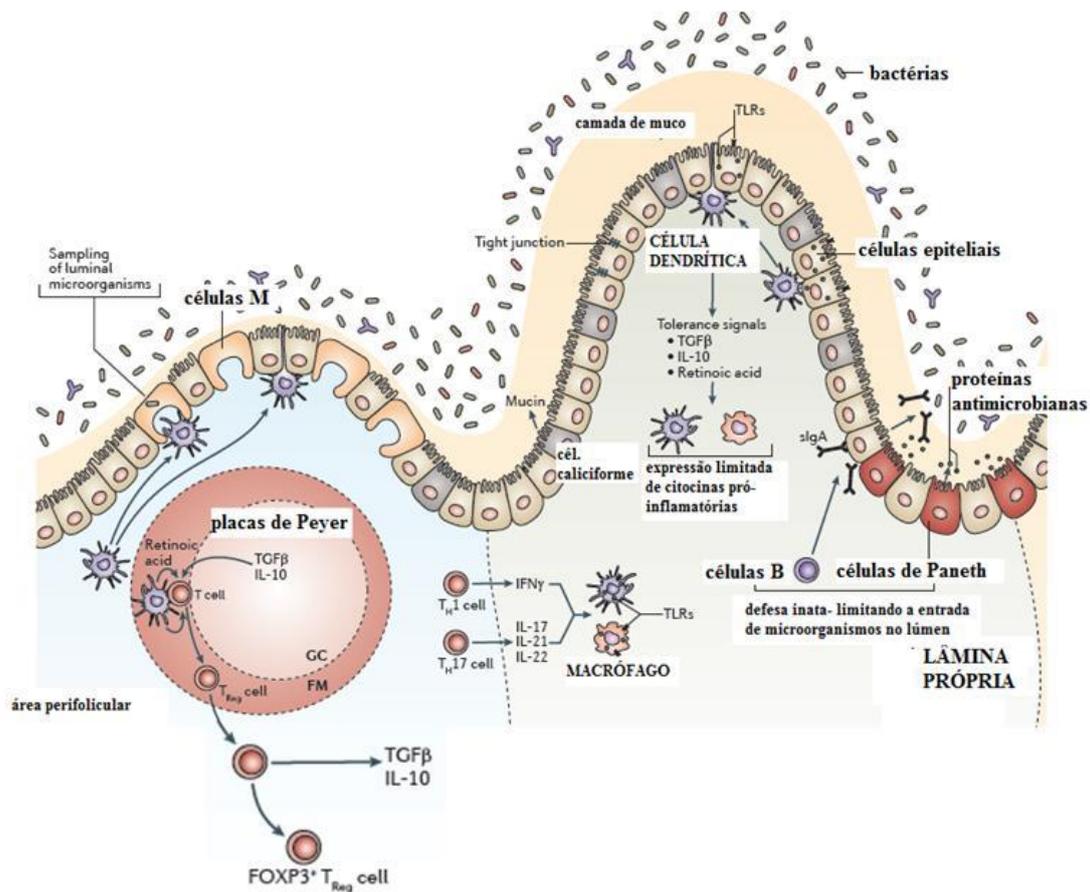


Figura 3: Componentes do sistema imune da mucosa. Fonte: Adaptado da Nature Reviews Microbiology, 2012.

Outras células importante no intestino são as células M que também funcionam como porta de entrada para antígenos e estão associadas às placas de Peyer ou aos folículos linfoides isolados. As células M carreadoras de antígenos estão em contato com DCs encontradas nas regiões interfoliculares e na região subepitelial das placas de Peyer, auxiliando na rápida apresentação de antígenos às células T e B (KUNISAWA *et al.*, 2012).

Os linfonodos mesentéricos (LNMs) compreendem os maiores gânglios linfoides do corpo. Antígenos capturados por células dendríticas nas placas de Peyer e lâmina própria são levados aos linfonodos mesentéricos por vasos linfáticos aferentes e são apresentados às células T. Esses linfócitos T se acumulam nos LNMs por meio de moléculas de adesão

como L-selectina e $\alpha\beta$ -integrina, as quais normalmente direcionam os linfócitos para as mucosas (WAGNER *et al.*, 1998).

As placas de Peyer (PP) são compostas por folículos ricos em células B circundados por uma malha de células T, chamada de regiões interfoliculares. As células B representam 75% das células encontradas nas PP e podem formar centros germinativos mesmo em condições de homeostasia, devida a constante estimulação com antígenos das bactérias comensais. Apenas 20% da população celular das PP são linfócitos T. As células T interfoliculares mantêm principalmente o fenótipo naive (virgem), porém nas PP são encontradas células T ativadas do tipo Th1 (T helper 1) produtoras de IFN- γ , células do tipo Th2 (T helper 2) produtoras de IL-4 (KUNISAWA *et al.*, 2012).

Os folículos linfoides isolados são tecidos linfoides organizados responsáveis pela efetuação da resposta imune antígeno-específica dentro da mucosa intestinal. Apresentam grande quantidade de células B efetoras e algumas células dendríticas em contato com as células M. Diferente das placas de Peyer, esses folículos não apresentam regiões interfoliculares ricas em linfócitos T, desse modo a maciça produção de IgA nesses locais se dá de forma independente de células T (SHODI *et al.*, 2012).

Abaixo da camada epitelial existe a lâmina própria, um tipo especial de tecido conjuntivo, responsável pela resposta imune efetora, onde são encontradas células como macrófagos, neutrófilos, linfócitos, mastócitos, células dendríticas e as recentemente descobertas células linfoides inatas (ILCs) que são em grande parte responsáveis pela resposta imune inata na mucosa (KUROSHIMA *et al.*, 2013).

A presença de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) na mucosa e nas criptas epiteliais têm sido usados como marcadores de doença inflamatória intestinal. Massiva infiltração de células polimorfonucleares para dentro das criptas tem sido diretamente correlacionada com sintomas e a injúria da mucosa vista em pacientes com doença inflamatória intestinal. Essas células causam danos na barreira protetora do epitélio, com destruição tecidual por dano oxidativo e proteolítico, e perpetuam a inflamação através da produção de mediadores inflamatórios (BRAZIL *et al.*, 2013).

Dentre o subgrupo de células linfóides inatas 1 (ILC1), as células NK da lâmina própria intestinal possuem um papel importante como primeira linha de defesa contra patógenos invasores, por meio da secreção de citocinas, como IFN- γ , e da lise dos microorganismos (COLONNA *et al.*, 2011).

Em relação ao sistema imune adaptativo de mucosa, as células T da lâmina própria variam entre as subpopulações Th1, Th2, Th17, Tregulatórias e Natural Killer T. (SPENCER *et al.*, 2011). Essas subpopulações de linfócitos T atuam no recrutamento de células da imunidade inata, combate aos microorganismos, regulação da resposta imune local, na produção de mucinas, de peptídeos antimicrobianos e na produção de IgA (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010). O controle desta resposta inflamatória envolve o balanço entre estas subpopulações de células T.

1.4 Células Natural Killer e seu papel no sistema imune da mucosa intestinal.

1.4.1 Origem das células NKs.

As células Natural Killer (NK) são originárias da medula óssea, a partir do progenitor linfoide comum, e fazem parte do sistema imune inato. Compreendem a terceira maior subpopulação de linfócitos e diferem dos demais pela ausência de expressão de marcadores de células T ou B. Foram descritas, inicialmente, em 1975, como células capazes de lisar células tumorais sem a necessidade de sensibilização prévia. Essa capacidade citotóxica "*natural*" deu origem ao seu nome "*Natural Killer*" (BENNETT *et al.*, 1992).

1.4.2 Função das células NKs.

O principal papel dessas células é promover a defesa inicial contra os micro-organismos, antes da ativação do sistema imune adaptativo. O reconhecimento e a resposta frente aos patógenos se dá pela presença e balanço entre dois tipos de receptores: os inibitórios, que reconhecem moléculas de MHC classe I, e os de ativação, que reconhecem ligantes específicos expressos nas células alvo, como produtos derivados de patógenos, moléculas induzidas pelo estresse, ligantes tumorais e próprios. A ativação das células NK, por meio dos receptores ativadores, pode acarretar a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF (FRENCH *et al.*, 2004), e anti-inflamatórias, como IL-10. Além disso, podem secretar uma variedade de quimiocinas; como CCL2, CCL-3, CCL4, CCL5 e CXCL8 que contribuem para o recrutamento de outras células do sistema imune além de direcionar a localização de células dendríticas na mucosa (VIVIER *et al.*, 2011).

Além de fazerem parte da resposta imune inata, elas podem direcionar a resposta imune adaptativa. Nos últimos anos, vários subtipos de células NKs têm sido detectados em camundongos e em humanos; incluindo células NKs com perfil de produção de citocinas tipo I ou tipo II, células NKs regulatórias, células NKs citotóxicas e células NKs apresentadoras de antígenos (HUNTINGTON *et al.*, 2007).

A maturação, desenvolvimento e ativação das células NKs é dependente de citocinas produzidas por macrófagos e células dendríticas, como IL-15, IL-12 e IL-18. Associado

à produção de citocinas e quimiocinas pelos linfócitos NK, o reconhecimento das células alvo pode ocasionar a liberação de perforinas e granzimas o que culmina com a ativação de caspases com consequente destruição celular por apoptose. Além do reconhecimento antigênico por meio dos receptores ativadores, as células NK podem interagir com a célula alvo por meio da ligação da NK à porção Fc de anticorpos IgG, um processo denominado citotoxicidade celular dependente de anticorpos. Isso é possível devido a presença do receptor de IgG CD16 (Fc γ RIII) na superfície das células NKs. (COLUCCI *et al.*, 2002). O simples reconhecimento da IgG por este receptor nas células NKs é capaz de causar sua ativação e degranulação (TSUKERMAN *et al.*, 2014).

1.4.3 Fenótipo das células NKs em murinos e humanos.

No sangue periférico humano as células NKs são divididas em duas grandes populações, aquelas CD16⁺ e as CD16⁻, onde a maioria, cerca de 90% delas, é CD16⁺. A ativação das células NKs é seguida geralmente da clivagem da molécula CD16 por metaloproteinases de matriz. Tsukerman *et al.* (2014), demonstraram que a redução na expressão de CD16 está presente quando as células NKs são estimuladas com determinadas linhagens de células tumorais, mas não com outras, sugerindo a dependência do tipo de estimulação antigênica para a ocorrência desse processo. Essas células CD16⁺ apresentam maiores funções efetoras, como citotoxicidade e secreção de citocinas.

Em camundongos, além da molécula CD16, as células NKs são identificadas pela presença das integrinas CD49b (DX5), CD69, CD86, NKG2D, ausência da molécula CD3, entre outros. As diferenças na expressão desses marcadores em camundongos e em humanos está demonstrado na figura 4.

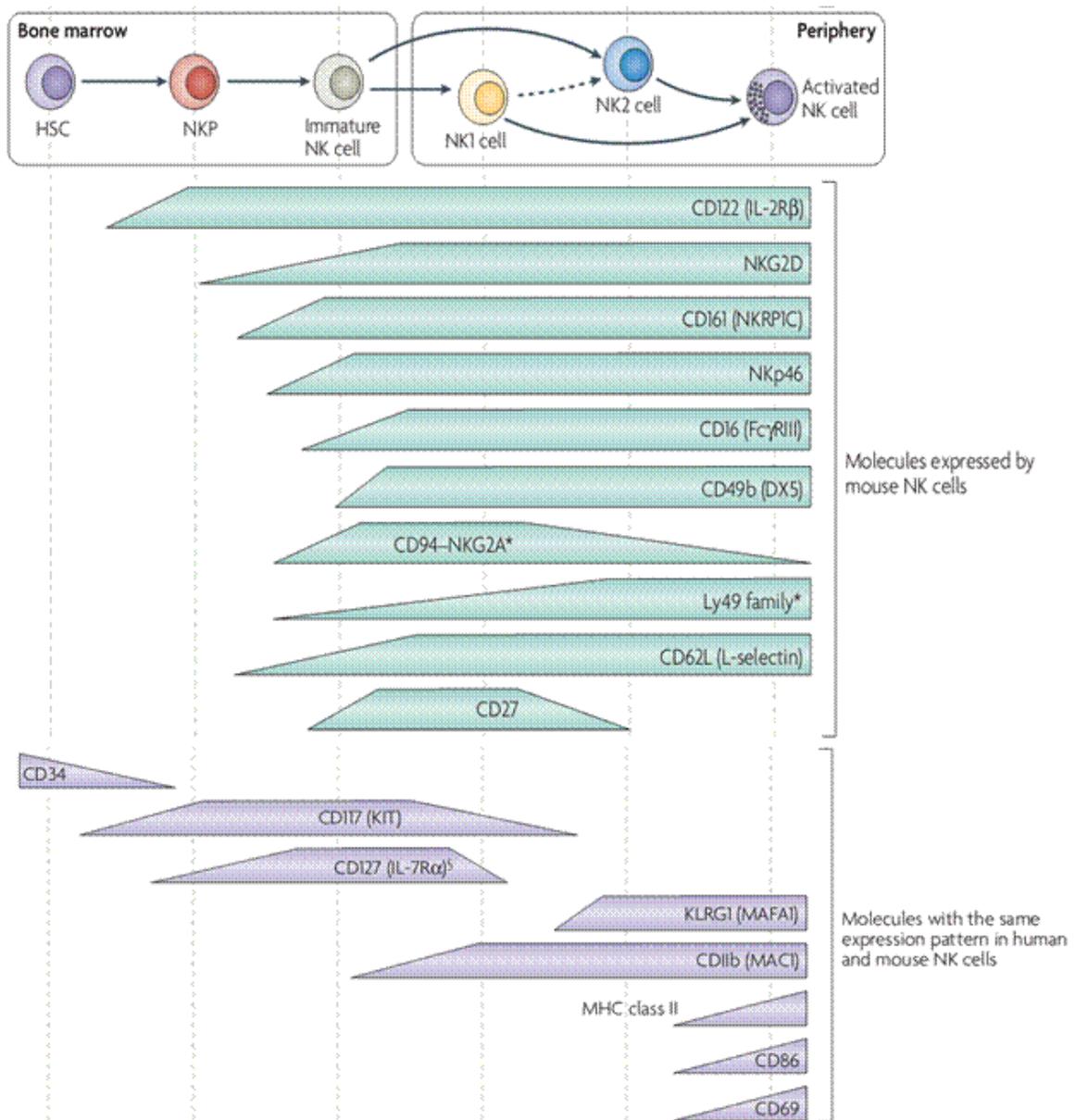


Figura 4: Expressão dos diferentes marcadores de células NKs de camundongos e humanos, conforme o processo de diferenciação. A figura demonstra a expressão de vários marcadores de células NKs em camundongos e humanos, ao longo dos seus estágios de maturação. Podemos observar a ausência da expressão de marcadores típicos de células NKs em seus precursores e aquisição de várias moléculas com o processo de maturação. Fonte: Adaptado de Huntington *et al.* (2007).

1.4.4 Papel das células NKs na mucosa intestinal.

O desenvolvimento e o papel biológico das células NKs na mucosa intestinal não está bem elucidado. Apesar disto, sabe-se que estas células, devido a sua rápida capacidade de secreção de citocinas, pode desempenhar um papel importante no intestino, agindo juntamente com as células dendríticas na regulação da resposta imune. Além disso, as NKs podem ocasionar a lise de células sobre estresse oxidativo ou células infectadas e contribuir para homeostasia de células epiteliais intestinais (TAKAYAMA *et al.*, 2008).

Disfunções no sistema imune de mucosa pode culminar com inflamação intestinal, por meio da ativação de células do sistema imune inato e adaptativo. As células NKs presentes na mucosa intestinal já foram relacionadas com diversas patologias inflamatórias, como doença de Crohn e colite ulcerativa (TAKAYAMA *et al.*, 2010). Egawa *et al.* (1986) demonstraram uma menor atividade de células NKs no sangue periférico de pacientes com doença de Crohn quando comparados aos indivíduos saudáveis e àqueles com doença em remissão. O mesmo já havia sido observado por Ginsburg *et al* três anos antes, em 1983. Apesar da menor atividade citotóxica das células NKs observada nesses estudos, a frequência dessas células encontrava-se em níveis normais no sangue periférico.

Apesar do seu papel relevante no trato gastrointestinal, ainda não foi investigado o envolvimento dessas células na mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.

1.5 Células T Natural killer (NKT)

1.5.1 Origem das células T Natural Killer (NKT)

A origem das células NKT continua sendo um ponto de controvérsia. Várias linhagens de células T são selecionadas positivamente após interações autoreativa de alta avides entre timócitos duplo-positivos e às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex – MHC*) ou às moléculas CD1 expressas por células epiteliais ou medulares do tecido tímico. Tais interações não levam à eliminação dessas células T, mas sim a uma alteração do programa celular resgatando as mesmas da morte por negligência (BENDELAC, 2004). Dentre estas linhagens estão

às células NKT que parecem surgir do mesmo precursor de timócitos duplo-positivos que originam linfócitos T convencionais (BOROWSKI, 2005).

Vários estudos sugerem que existem dois sítios independentes formando os precursores das células NKT: os órgãos hematopoiéticos que produzem as células NKT ao longo da vida, compreendendo o desenvolvimento do fígado e da medula óssea de adultos, e a maturação do timo, sugerindo que eles exercem suas funções em localizações especializadas (SHIMAMURA, 2001).

As células T *Natural Killer* (NKT) são um grupo distinto de células T e foram originalmente descritas como linfócitos T que expressam ao mesmo tempo o receptor de células T (TCR) e também proteínas de superfície da linhagem de células *Natural Killer* (NK) do tipo C-lectina NK1.1 em camundongos C57BL/6 (CD161 nos humanos). Recentemente essas células foram definidas como um subtipo único de linfócitos T que expressam a cadeia alfa (α) invariante V α 24 e repertório V β limitado, sendo a grande maioria V β 11 (LEE, 2002). Também já foram descritas células T reativas a CD1d com repertório de TCR diverso (BERZINS, 2004; BRIGL and BRENNER, 2004).

Ao contrário dos linfócitos T convencionais que interagem com peptídeos associados ao MHC de classe I ou II, as células NKT são conhecidas como linfócitos T não convencionais por seu receptor interagir com antígenos glicolipídicos associados à molécula CD1d (molécula MHC não-clássica), operando na fronteira entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (VAN KAER, 2007).

Em geral as células NKT representam menos de 1% da população de linfócitos T no sangue periférico humano e possuem funções distintas dos linfócitos T convencionais. As células NKT se distinguem das demais células pela diferença na sua especificidade, diversidade de TCR, “*homing*” preferencial para alguns tecidos, expressão de co-receptores e secreção de citocinas (MATSUDA, 2000).

1.5.2 Tipos de células NKT

Atualmente é proposto que as células NKT podem ser classificadas em três grupos distintos: células NKT tipo I (iNKT), células NKT tipo II e células NKT $\alpha\beta$. Os dois

primeiros grupos são ativados pela molécula de MHC não-clássica chamada CD1d e terceiro grupo pelas moléculas de MHC de classe I ou de classe II (GODFREY, 2004).

Entre as características inatas das populações de células NKT está a habilidade de reconhecer um número limitado de antígenos (LEE, 2002). As células NKT invariantes são assim chamadas porque expressam um TCR invariante codificado pelo segmento V α 14J α 18 que se associa a um número limitado de cadeias V β em camundongos (GODFREY e KRONENBERG, 2004) e, correspondentemente, à cadeia V α 24J α 18 associada à cadeia V β 11, em seres humanos.

Os receptores para o antígeno das células NKT reconhecem lipídeos que são ligados a moléculas CD1. A CD1d é uma molécula crítica para o desenvolvimento e função das células iNKT e também para as células NKT tipo II, é um membro da família CD1 de MHC de classe I presente em várias células apresentadoras de antígenos (APC). Todas as moléculas CD1 são glicoproteínas de superfície associadas à microglobulina β 2 (MOODY, 2005). Em humanos, a família CD1 é composta por cinco membros, designados CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e. Com base em relações de homologia e detalhes de sua expressão e função CD1a/b/c/e são classificados como moléculas do grupo 1. O grupo 2 é formado apenas pela molécula CD1d. Ambos os grupos das moléculas CD1 são proteínas de ligação que podem apresentar lipídeos próprios e glicolipídeos às células T. (BROSSAY, 1998).

A capacidade das células NKT de camundongos em reconhecer antígenos glicolipídicos associados ao CD1d de humanos e vice-versa mostra a conservação das células NKT no processo evolutivo e sugere um papel único para as mesmas. Isso faz com que as células NKT reconheçam antígenos que parecem ser ignorados pelos linfócitos T convencionais (SANDBERG, 2004).

As células NKT são capazes de reconhecer glicolipídeos conservados, endógenos isso-globo-tri-hexosil-ceramida (iG β 3) (ZHOU, 2004) e exógenos como antígenos bacterianos tais como glicosfingolipídeos, encontrados na parede celular de *Sphingomonas capsulata* (WU, 2005), e manosídeo fosfatidil inositol (PIM), um glicolipídeo presente na parede celular micobacteriana (FISCHER, 2004).

Apesar do repertório limitado, as células NKT apresentam duas diferentes estratégias no reconhecimento de patógenos. O primeiro mecanismo observado no

reconhecimento de bactérias gram-negativas, LPS positivos, ocorre pela sinalização de receptores do tipo Toll (TLR) (KINJO, 2005). O segundo mecanismo observado no reconhecimento de bactérias gram-negativas, LPS negativo, ocorre pelo reconhecimento específico de glicosilceramidas presentes na parede celular da bactéria, apresentadas por CD1d, sendo que esta via de sinalização assegura o reconhecimento de patógenos que não apresentam ligantes para TLRs em sua parede celular (MATTNER, 2005). É importante ressaltar que o LPS é uma estrutura predominante na membrana celular de bactérias gram-negativas e um dos mais potentes ativadores da imunidade natural (KINJO, 2005).

1.5.3 Subpopulações das células NKT

As subpopulações de células NKT diferem na expressão de integrinas, moléculas envolvidas na interação de célula-célula e na matriz extracelular (ROLF, 2008). As células NKT podem se dividir em subgrupos distintos CD4⁺ e CD4⁻ em camundongos e nos humanos e macacos também podem expressar os fenótipos CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ (McDONALD, 2003).

A molécula CD4 possui a capacidade de ativar células T restritas ao MHC classe II e essa ligação parece estabilizar a interação entre o TCR/MHC classe II. Os resultados apresentados por Chen *et al.* (2007) mostraram que a molécula CD4 pode interferir na ativação das células NKT independente do ligante na célula apresentadora de antígeno (APC). As células NKT CD4⁻ tendem a produzir citocinas Th1 que secretam IL-2, TNF- α e IFN- γ , possuem função efetora da imunidade mediada por células contra microorganismos intracelulares e reações de hipersensibilidade do tipo tardia e expressam o receptor co-estimulatório de células NK (NKG2D e CD94) (COFFMAN, 2006). Esta subpopulação CD4⁺ também produz citocinas Th2 que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que, juntamente com IL-4, inibem algumas funções dos macrófagos (FUSS, 2004).

1.5.4 Funções das células NKT

As células NKT possuem um papel importante em repostas alérgicas, inflamatórias, antitumorais e autoimunes (CROWE, 2003; MURDOCH, 2007; JIN, 2009), além de participarem da regulação da resposta imunológica diante de infecções virais e bacterianas (GODFREY, 2000).

Os subtipos CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ parecem definir seus perfis de expressão gênica, produção de citocinas e capacidade de ativar células vizinhas (YULING, 2009; LIN, 2006). Uma das características dessas células que desperta grande interesse é sua capacidade de secretar diferentes citocinas poucas horas após sua ativação, justificando sua participação numa gama enorme de respostas imunes. Estudos indicam que as células NKT podem ter um fenótipo “Th0”, pois podem secretar rapidamente grandes quantidades tanto de citocina Th1 IFN- γ , quanto da citocina Th2 IL-4. Além disso, IFN- γ produzido por células NKT pode ativar células NK, reforçando este braço da imunidade inata (EBERL, 2000).

1.5.5 Frequência das células NKT

As células NKT em camundongos são encontradas principalmente no fígado, timo e baço, onde constitui até 30 - 40%, 0,5% e 1% dos linfócitos nestes órgãos respectivamente. Elas são menos abundantes no sangue periférico. A distribuição das células NKT é bem menos estudada em seres humanos, no entanto, células iNKT compreende 0,008 – 1,176% das células T do sangue periférico (MARSH, 2009).

No sangue periférico de adultos, 50% das células NKT são CD4⁻ com baixa ou nenhuma expressão de CD8. Este achado sugere que as células NKT possuem desenvolvimento timo-independente, ou seja, são produzidas em um determinado período de tempo durante o desenvolvimento tardio ou mesmo logo após o nascimento (SANDBERG, 2004).

Existem poucos estudos sobre a frequência de células NKT em indivíduos saudáveis. No estudo realizado por DelaRosa *et al.* (2002), a frequência média de células V α 24, verificada pela técnica de citometria de fluxo, em adultos jovens saudáveis foi de cerca de 0,3%. Montoya *et al.* (2007) demonstrou, utilizando a técnica de citometria de

fluxo, que a média da frequência de células iNKT/V β 11 de indivíduos saudáveis é de 0,17%.

Como a frequência de células NKT Va24 no sangue periférico de indivíduos saudáveis varia de 0,001 a 1%, é difícil avaliar as diferenças entre indivíduos normais e aqueles que apresentam algum tipo de doença (EMOTO, 1999).

1.5.6 Células NKT e seu papel na mucosa intestinal

Várias subpopulações de células NKT já foram identificadas na mucosa intestinal de camundongos e humanos. Nos murinos, cerca de 4-10% dos linfócitos da lâmina própria no intestino expressam marcadores de células NKT. Estas células são importantes no controle de infecções na mucosa, na proteção de células epiteliais e no recrutamento de células inflamatórias. Além disso, algumas células NKT podem ter função regulatória, por meio da produção de IL-10 (Revisado por MIDDENDORP *et al.*, 2009).

Em um modelo de colite experimental induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), as células NKT intraepiteliais foram imprescindíveis para controlar a penetração bacteriana através da superfície mucosa lesada, tendo portanto um papel protetor neste modelo (ISMAIL *et al.*, 2009). As células NKT podem produzir IL-22, uma citocina da família da IL-10, que medeia a comunicação entre células epiteliais e células do sistema imune. Essa citocina está relacionada com a restauração da função de barreira após o dano epitelial mediado pela inflamação, além de aumentar a produção de peptídeos microbianos, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Entretanto, similarmente à células Th17, as NKT intestinais podem produzir IL-17 e contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais em modelos animais. As células NKT podem, portanto, desempenhar tanto um papel protetor como patológico na mucosa intestinal (MIDDENDORP *et al.*, 2009). A figura 5 resume esses papéis das células NKT na mucosa intestinal.

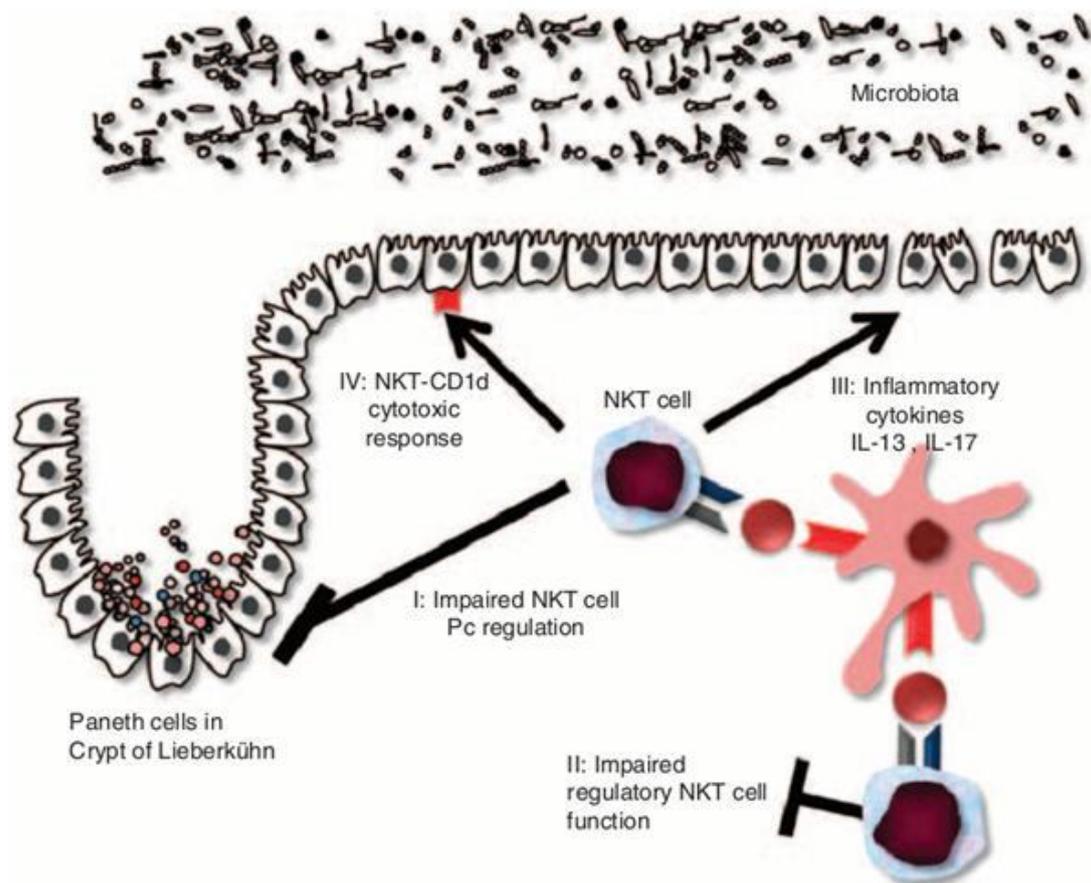


Figura 5: Efeitos do bloqueio ou da ativação das funções das células NKT na inflamação intestinal Fonte: Middendorp *et al.*, 2009.

I- Função das células NKT comprometida acarreta o decréscimo na produção de peptídeos antimicrobianos, o que, em conjunção com a colonização microbiana local, está associado ao desenvolvimento de doenças inflamatórias;

II- Ausência ou inibição de células NKT regulatórias reduz seu papel na homeostasia da mucosa;

III- Produção de citocinas, como IL-13 e IL-17, rompe a integridade da mucosa intestinal;

IV- Células NKT citotóxicas ativadas interagem com células epiteliais que expressam CD1d;

Atualmente não existem trabalhos demonstrando a frequência das populações de linfócitos presentes na lâmina própria após o tratamento com o 5-FU, fato este importante para conhecer os mecanismos de defesa da barreira intestinal após os efeitos colaterais causados pela quimioterapia, como por exemplo, a mucosite intestinal. Portanto, esse trabalho propõe estudar as alterações morfológicas e quais populações de linfócitos estão presentes no pico da inflamação da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Identificar e caracterizar as populações de linfócitos NK, NKT e T na lâmina própria de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.

2.2 Específicos

- ✓ Padronizar, para as nossas condições experimentais, o modelo de mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos C57BL/6J.
- ✓ Relacionar os parâmetros de leucometria, atividade da mieloperoxidase, curva ponderal e morfometria com o desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU.
- ✓ Avaliar as diferenças no perfil de células NK e NKT nos camundongos que receberam 5-FU ou salina, de acordo com a expressão da molécula CD16.
- ✓ Avaliar a razão TCD4/TCD8 e sua relação com o desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J, pesando entre 19-25 gramas, com idade entre 6-8 semanas, mantidos no Núcleo de Biologia Experimental – NUBEX, da Universidade de Fortaleza. Esses animais foram aclimatados em gaiolas, permanecendo em estantes com sistema automático de ventilação, filtragem do ar e controle de luminosidade, com livre acesso a ração e água. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Cuidado Animal da Universidade de Fortaleza, com parecer de nº 1.2563.6/2015.

Foram realizados dois grupos com 6 animais cada:

Grupo 1: Camundongos desafiados com o quimioterápico 5-fluorouracil em dose única (150 mg/Kg), via intraperitoneal e realizada a eutanásia com 72 horas.

Grupo 2: Camundongos recebendo solução salina em dose única (150 mg/Kg), via intraperitoneal e realizada a eutanásia com 72 horas.

Os animais foram eutanasiados após 3 dias (72h) da injeção com 5-FU, porque esse período corresponde ao pico da reposta inflamatória de mucosite.

3.2 Equipamentos e Materiais

Durante o curso dos experimentos, foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos, os quais são citados a seguir:

- Balança digital eletrônica para pesagem de animais – Filizola;
- Citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD).
- Balança analítica Bioprecisa (Electronic Balance FA-2104N);
- Centrífuga refrigerada para tubos Sigma 1-14k – Uniscience;
- Tubos Eppendorfs;
- Geladeira e freezer Thermo Scientific (-80°C);
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc.);
- Microscópio Olympus acoplado ao computador.
- Pipetas Eppendorf de 1000, 200 e 20 µL;

- Ponteiras para pipetas;
- Seringas (B-D Plastipak);
- Tubos de polipropileno para centrífuga;
- Vidraria: béqueres, pipetas manuais e tubos de ensaio;
- Vórtex Maxi Mix II Thermolyne tipe 37600 mixer.
- Estufa Quimis;
- Peneira de células de 70 μm ;
- Tubos de citometria.

3.3 Drogas e Reagentes

- 5-Fluorouracil (250mg/10mL, Eurofarma-São Paulo).
- Anticorpo monoclonal CD3 conjugado com Ficoeritrina (PE)- clone 145-2C11, EXBIO Praha (Vestec, República Tcheca).
- Anticorpo monoclonal CD4 conjugado com Ficoeritrina (PE)-Clone GK1.5, EXBIO Praha. (Vestec, República Tcheca).
- Anticorpo monoclonal CD8a conjugado com Peridinin chlorophyll rotein (PerCP)- Clone 53-6.7, EXBIO Praha (Vestec, República Tcheca).
- Anticorpo monoclonal CD11a conjugado com isoticionato de fluoresceína (FITC)-Clone M1/70- eBioscience (San Diego, CA, EUA).
- Anticorpo monoclonal CD11b conjugado com Ficoeritrina (PE)-Clone M1/70- eBioscience (San Diego, CA, EUA).
- Anticorpo monoclonal CD45 conjugado com Peridinin Chlorophyll Protein e cyanine (PerCP-Cy5.5)- Clone 30-F11- eBioscience (San Diego, CA, EUA).
- Anticorpo monoclonal CD16 conjugado com Peridinin Chlorophyll Protein e cyanine (PerCP-Cy5.5)- Clone 30-F11- eBioscience (San Diego, CA, EUA).
- Anticorpo monoclonal CD49 conjugado com Ficoeritrina (PE)-Clone M1/70- eBioscience (San Diego, CA, EUA).
- Anticorpo monoclonal CD69 conjugado com isoticionato de fluoresceína (FITC)-Clone M1/70- eBioscience (San Diego, CA, EUA).
- Anticorpo monoclonal MHCII conjugado com isoticionato de fluoresceína (FITC)-Clone M1/70- eBioscience (San Diego, CA, EUA).

3.4 Indução da Mucosite Intestinal pelo tratamento com 5-Fluorouracil

Para a indução da mucosite intestinal, administrou-se 5-FU (150 mg/kg, via intraperitoneal, dose única) (figura 6) nos camundongos. No terceiro dia, os animais foram eutanasiados por overdose do anestésico tribromo de etileno. Foram retiradas amostras do intestino delgado para citometria de fluxo e para Mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente nos grânulos dos neutrófilos e macrófagos.



Figura 6: Administração intraperitoneal de 5-FU em camundongos. Fonte: Labiconte.

3.5 Análise Ponderal

Os animais foram pesados diariamente, preferencialmente no mesmo horário, antes da administração do 5-fluorouracil e até o dia da eutanásia.

3.6 Leucometria

Os animais foram previamente anestesiados com tribromo de etileno para coleta de 20 μ L de sangue que foi diluído imediatamente em 380 μ L da solução de Turk (Ácido acético 2%, Violeta Genciana 0,2%). Em seguida, o número total de leucócitos plasmáticos foi determinado para verificar o efeito do 5-fluorouracil na indução da

leucopenia e confirmar o efeito citotóxico da quimioterápico. Essa observação serviu como controle da atividade do fármaco sobre o animal. A contagem dos leucócitos plasmáticos foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer juntamente com o uso de microscópio óptico (100 x, Olympus CX3, Tóquio, Japão). Os resultados foram expressos como número total de leucócitos contados nos quatro campos da câmara e posteriormente multiplicados pelo fator de correção da câmara. Por fim, os valores foram expressos como n° células/mm³ (LIMA-JÚNIOR, 2008).

3.7 Análise morfométrica

Depois do sacrifício, amostras do intestino (duodeno, jejuno e íleo) foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10% durante 24 horas e posteriormente armazenadas em álcool 70%. Em seguida, foram desidratadas em álcool com diferentes concentrações e fixadas em parafina. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) para serem analisados.

Na análise morfométrica, foram analisados os parâmetros altura dos vilos e profundidade das criptas, que são marcadores de integridade do tecido intestinal. A altura do vilos foi medida a partir da linha da base até o seu topo. A profundidade da cripta foi medida a partir da linha da base até o fundo da cripta (figura 7). Foram observadas aproximadamente 10 vilos e criptas de animal por grupo (n=4 animais por grupo) utilizando um microscópio óptico (Olympus CX3, Tóquio, Japão) e sistema de aquisição de imagens (Q-Color 3, Olympus, Tóquio, Japão). A análise dessas medidas foram feitas através do programa *Image J 1.4*[®] (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA), cuja calibração foi realizada através de uma micro-régua. Todas as fotos receberam uma codificação e não foram informadas para a pessoa que fez a análise morfométrica. Foi realizado um treinamento prévio com a pessoa que fez as análises.

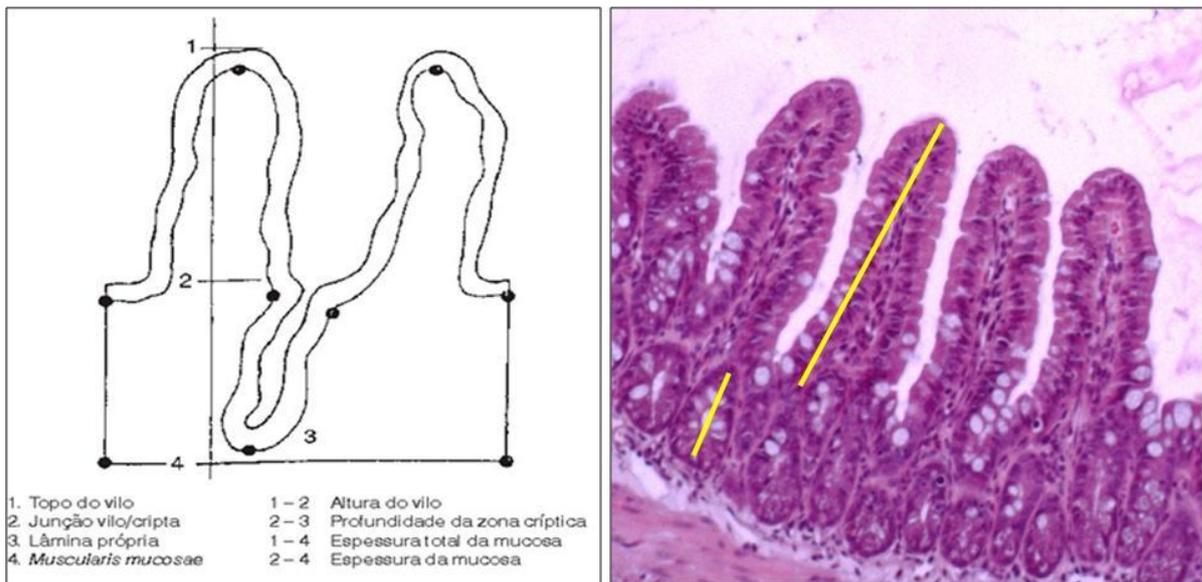


Figura 7: Modelo esquemático da análise morfométrica da altura do vilão e da profundidade da cripta utilizando o programa *Image J 1.4*[®] (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Fonte: Adaptado de A - PIRES, A. L. G.; SILVEIRA, T. R.; SILVA, V. D. Estudo morfométrico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente. *J Pediat.*, v. 79, p. 329-3, 2003.

3.8 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, cuja presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de ELISA. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por Bradley *et al.* (1982), utilizando 0,0005% de peróxido de nitrogênio como substrato para a MPO. Uma porção do duodeno, jejuno e íleo foi coletada e incubada em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50 mg de tecido por mL, homogeneizada e centrifugada (1500 g/20 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 2 mL e novamente centrifugado (10 min) para melhor remoção de contaminantes. Após colocação de 10 µL do sobrenadante em placas de 96 poços, 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H₂O) foram adicionados e lidos a 450 nm ($t_0=0$ min e $t_1=1$

min). A unidade da atividade de MPO será definida como aquela capaz de converter 1 mmol de peróxido de nitrogênio em água em 1 minuto.

3.9 Análise das populações de linfócitos no intestino proximal por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia, baseada no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos), recursos de informática, utilizada para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas como por exemplo: vários tipos de células, protozoários e bactérias. Esta tecnologia é usada para determinar componentes e propriedades de células e organelas celulares que fluem em uma suspensão celular.

Os linfócitos da lâmina própria intestinal foram obtidos segundo protocolo adaptado de Williams *et al.* (2010). O intestino delgado foi coletado e as placas de Peyer foram removidas. Em seguida, o intestino foi aberto longitudinalmente, cortado em peças de 5mm e lavado extensivamente em PBS gelado. As peças foram colocadas em tubo falcon, contendo meio RPMI completo com 10% SFB, e incubadas em agitação (150rpm/min) por 30 minutos, 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. O tecido remanescente foi incubado com Colagenase-D (400 U/ml), por 60 minutos, a 37°C, para obtenção dos linfócitos da lâmina própria. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm, 20 min, 4°C. O sedimento foi ressuspensado em 4ml de meio RPMI e a suspensão novamente filtrada com um separador celular de 70 μ . O volume celular foi submetido à separação em dois gradientes de concentração de percoll (44% e 67%) para obtenção dos linfócitos.

As células após a separação em gradiente de percoll foram ressuspensas em 1ml de tampão de FACS. Depois, 10 μ L da suspensão de células foi colocado em 90 μ L de azul de tripan (45 μ L de tripan + 45 μ L de PBS). Em seguida, 10 μ L das células em tripan foi colocado na câmara de Neubauer. Com o auxílio do microscópio óptico, usando um aumento de 40x, foram contadas todas as células mononucleares não coradas pelo azul de tripan dos quatro quadrantes externos da câmara (Figura 8).

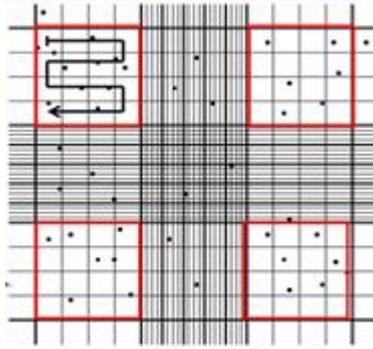


Figura 8: Demonstração da contagem de células viáveis usando azul de tripan na câmara de Neubauer.

Foi feita a média, multiplicando por 10^4 e pelo fator de diluição (10). Células com viabilidade de 90% seguiram para a citometria.

Os linfócitos da lâmina própria foram distribuídos em tubos de citometria, em volume de $200\mu\text{L}$, e marcadas com os anticorpos de superfície com diluição de 1:100 e volume de $1\mu\text{L}$ por 30 minutos, 4°C , ao abrigo da luz. Após duas lavagens em tampão de FACS as células foram fixadas em PFA 1% e a leitura realizada em FACS Calibur, com aquisição de 50.000 eventos na *gate* de linfócitos. O fenótipo das células foi definido conforme os painéis abaixo:

- ✓ **Painel 1 (células):** CD69 FITC, CD49b PE, CD16 PerCP, CD3APC
- ✓ **Painel 2 (células):** CD4 PE, CD8 PerCP; CD3 APC, MHCII FITC
- ✓ **Painel 3 (células):** CD11a FITC, CD11b PE, CD45 Percp

3.9.1 Estratégia de seleção das subpopulações linfocitárias.

Para seleção das populações de células NK, NKT, TCD4 e TCD8 foi realizado inicialmente uma *gate* na população linfocitária de acordo com as características de tamanho (FSC- forward scatter) e granulosidade (SSC- side scatter) (Figura 9). A padronização foi feita com animais do grupo salina. Para análise das células NK e NKT, um primeiro *dot plot* com os marcadores CD69-FITC e CD49b-PE foi realizado. Em seguida, foi feito uma *gate* na população duplo-positiva para esses marcadores e a análise da expressão de CD16-PerCP e CD3-APC dentro dessa *gate*. A frequência das subpopulações de TCD4 e TCD8 foi identificada em um *dot plot* de CD3-APC x CD4-PE ou CD8-PerCP. Os quadrantes foram definidos de acordo com os respectivos controles isotípicos.

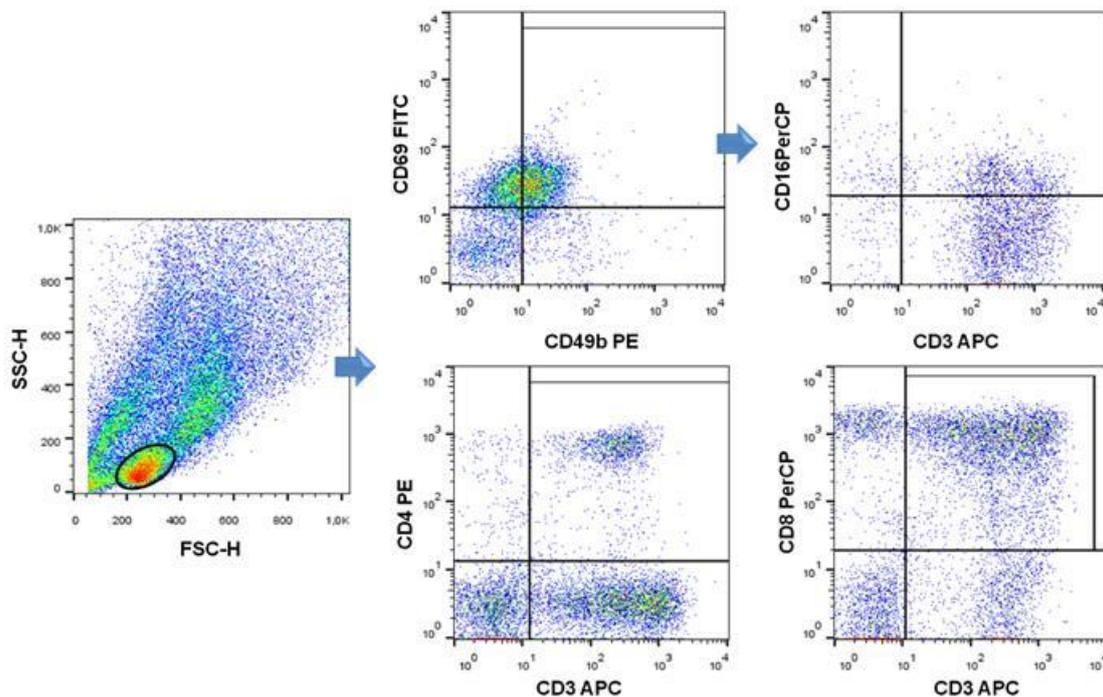


Figura 9: Estratégia de seleção das subpopulações linfocitárias. Fonte: Próprio Autor.

Como ilustrado na figura 10, as células NKTs avaliadas no nosso estudo, tanto dos animais que receberam salina como aqueles que receberam 5-FU, foram CD69⁺ com baixa expressão de CD49b.

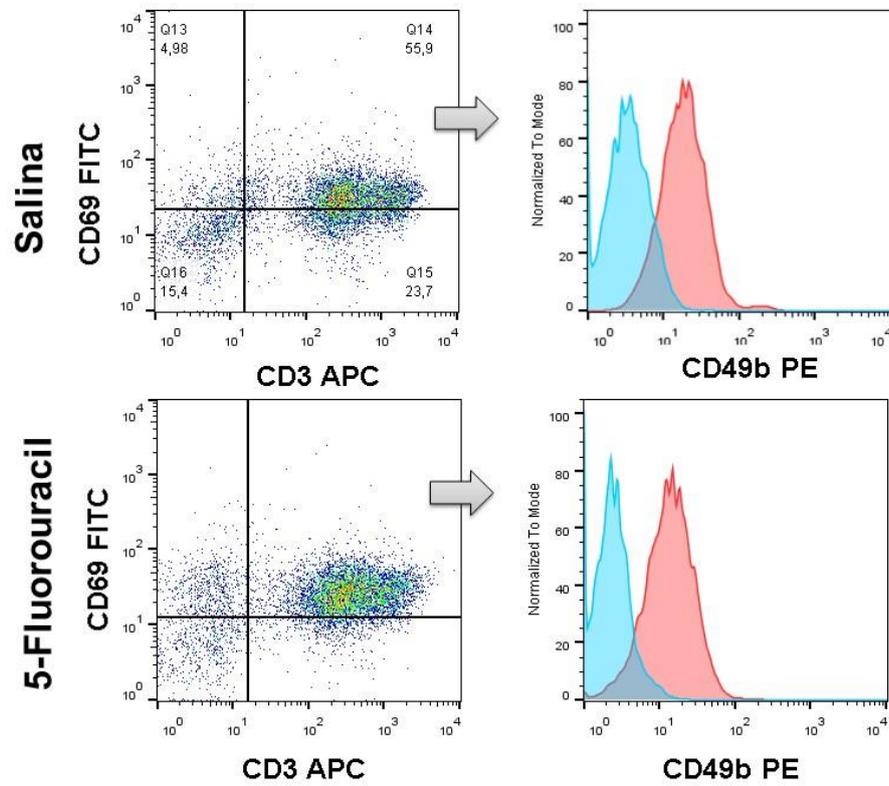


Figura 10: Histograma. Fonte: Próprio Autor.

3.10 Análise Estatística

Foi utilizado o teste de t de Student não-pareado para comparação entre dois grupos. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os dados de citometria foram analisados por meio do programa FlowJo, versão 7.6.5. Todos os testes foram realizados pelo programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism 6 Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação Ponderal

O desafio com o 5-FU (150 mg/kg, dose única, intraperitoneal) causou redução significativa no peso dos animais que receberam a droga em relação ao grupo salina. ($p < 0,001$) (Figura 11). Todos sobreviveram ao desenho experimental.

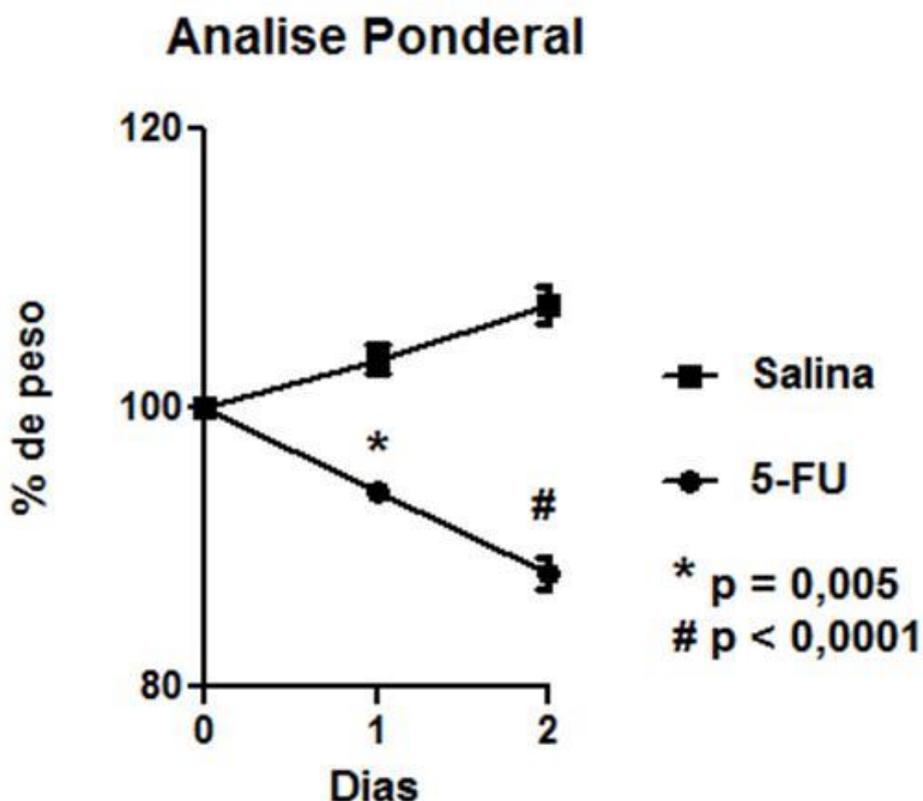


Figura 11: Efeito da administração do 5-fluorouracil sobre o peso corporal de camundongos C57BL/6J. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de camundongos por grupo igual a 6.

4.2 Leucometria

Observou-se uma redução significativa do número de leucócitos/mm³ do sangue dos animais desafiados com 5-FU (150 mg/kg) ($p < 0,001$) em relação ao controle Salina, o que comprova o papel citotóxico do 5-FU sobre a produção de leucócitos na medula óssea. (Figura 12).

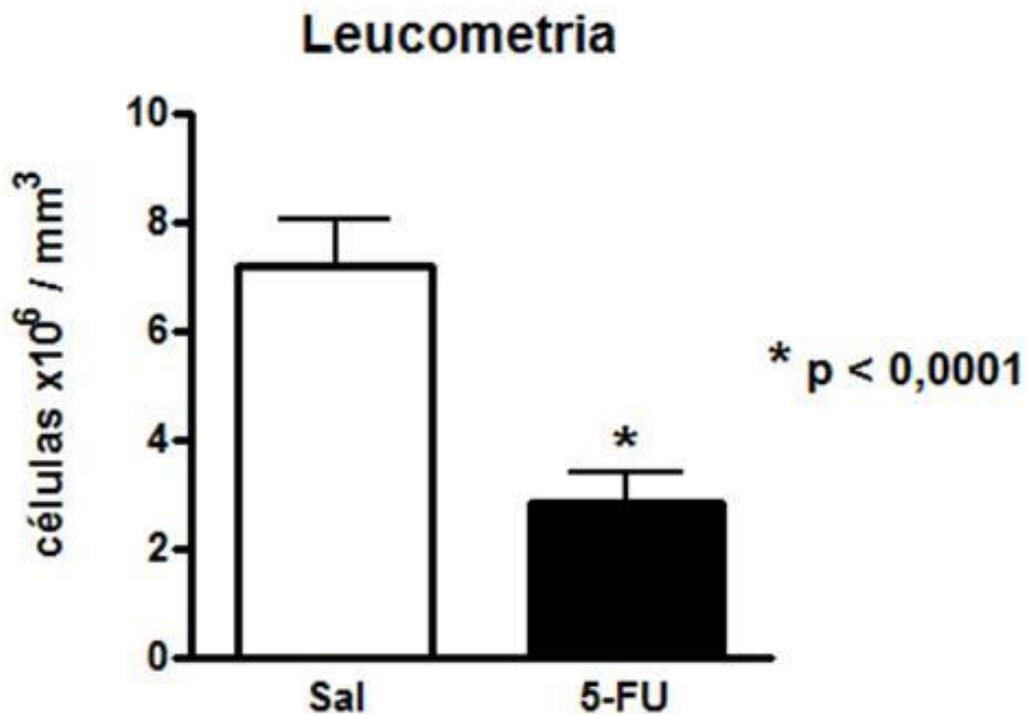


Figura 12: Efeito da administração do 5-fluorouracil sobre a leucometria de camundongos C57BL/6J. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.3 Avaliação das alterações histológicas na mucosite intestinal nos animais desafiados com 5-FU (150 mg/kg) e tratados com salina.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) induziu mucosite intestinal nos camundongos, causando uma resposta inflamatória com aumento de infiltrados celulares em todas as porções do intestino delgado, ao contrário do que foi evidenciado no grupo controle que receberam solução salina (150 mg/kg). Além disso, foram identificados atrofia dos vilos e desarranjo das criptas, ao contrário do que foi evidenciado no grupo controle. (Figura 13

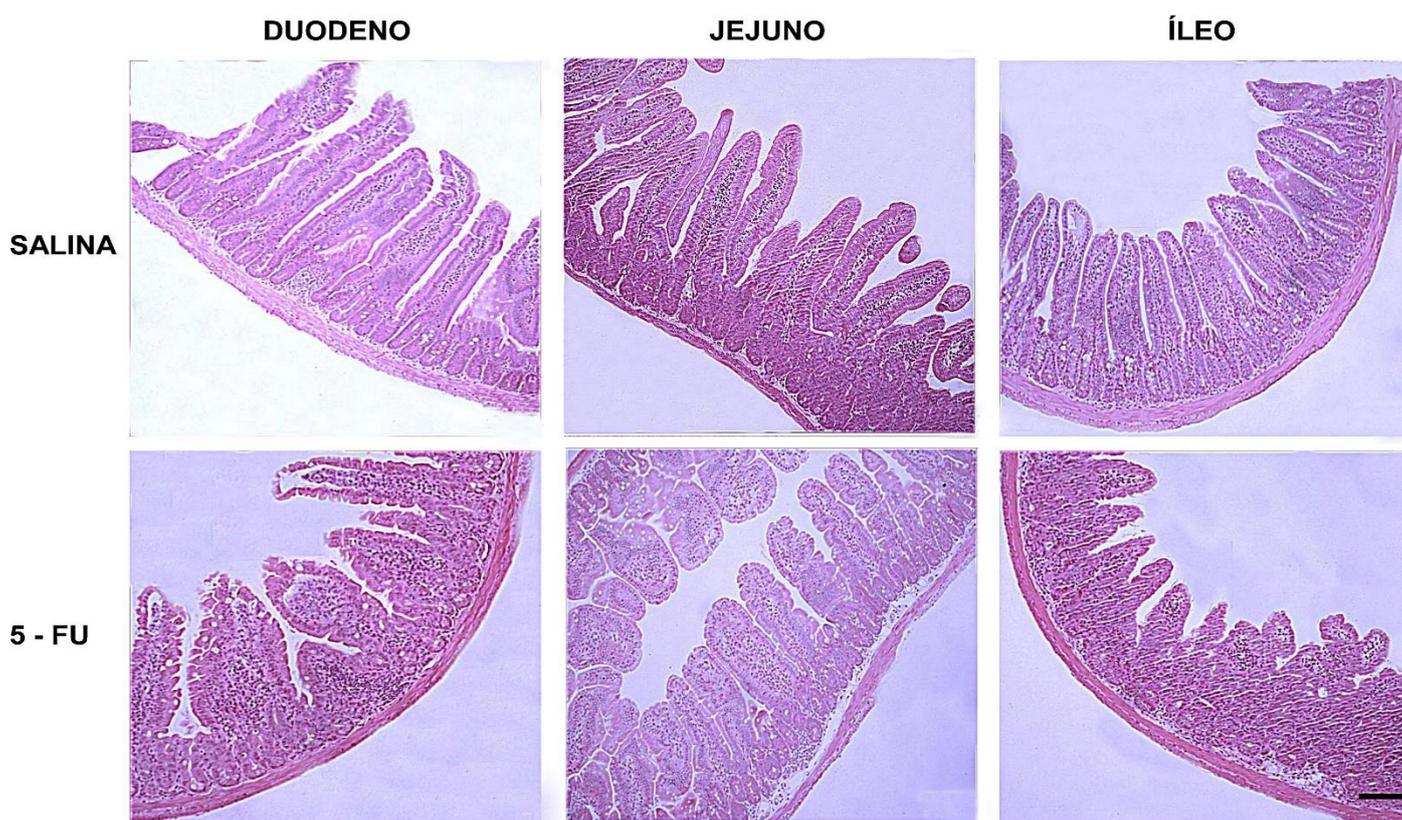


Figura 13: Histologia representativa do intestino proximal de camundongos C57BL6J após a indução de mucosite intestinal pelo 5-FU (150mg/kg) via intraperitoneal, corados com HE. (x 100). Os animais foram desafiados pela injeção de 5-FU (150 mg/kg, via i.p, dose única) ou receberam solução salina e foram sacrificados com 72 horas. O duodeno foi fixado em formaldeído a 4%, e encaminhado para processo histológico. Coloração em HE (X100). Escala: 20µm.

4.4 Avaliação das alterações histológicas na mucosite intestinal nos animais desafiados com 5-FU (150 mg/kg) e tratados com salina.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) induziu mucosite intestinal nos camundongos, causando uma resposta inflamatória com aumento de infiltrados celulares em todas as porções do intestino delgado, ao contrário do que foi evidenciado no grupo controle que receberam solução salina (150 mg/kg). Além disso, foram identificados atrofia dos vilos e desarranjo das criptas, ao contrário do que foi evidenciado no grupo controle. (Figura 14).

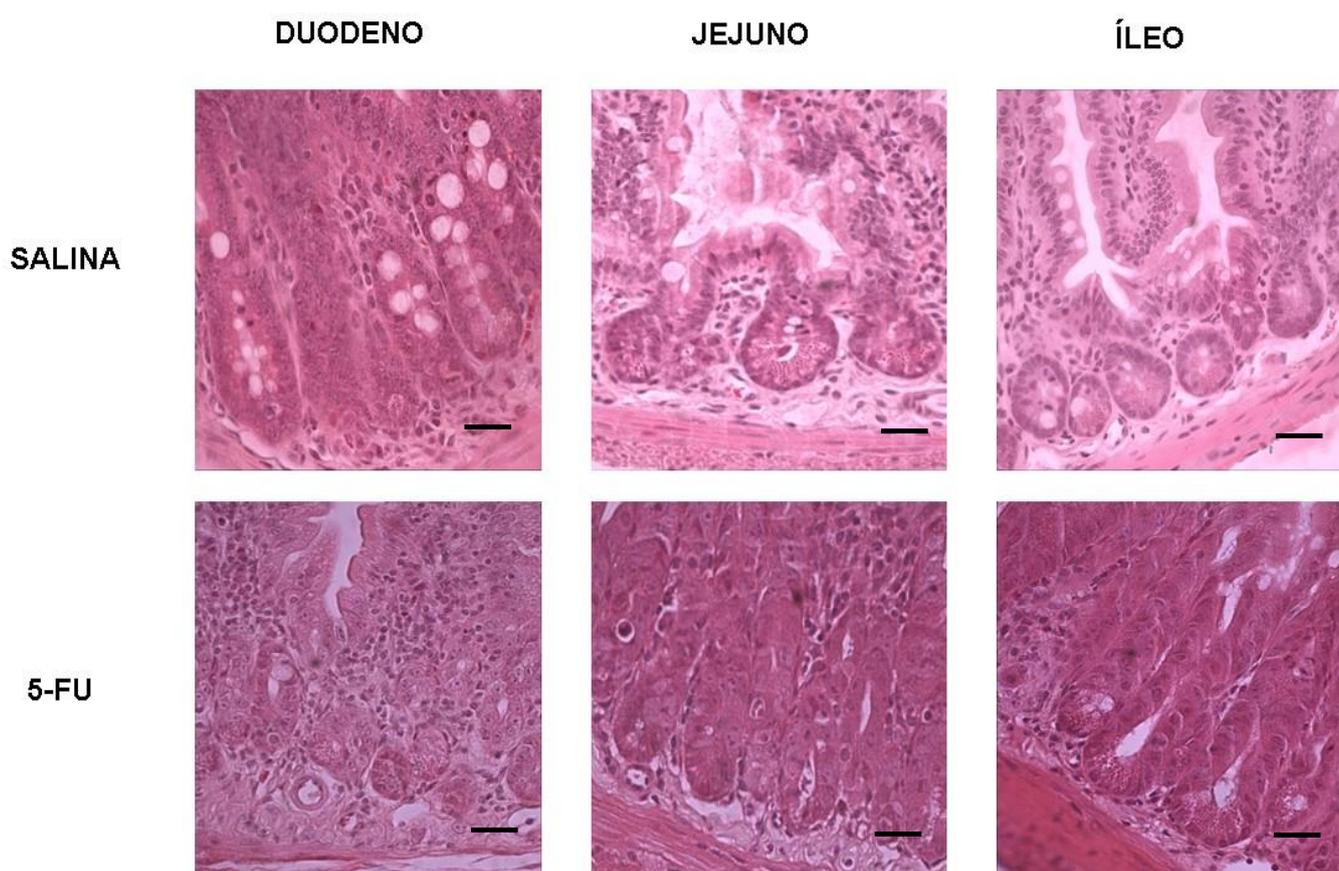


Figura 14: Histologia representativa do intestino proximal de camundongos C57BL6J após a indução de mucosite intestinal pelo 5-FU (150mg/kg) via intraperitoneal, corados com HE. (x400). Os animais foram desafiados pela injeção de 5-FU (150 mg/kg, via i.p, dose única) ou receberam solução salina e foram sacrificados com 72 horas. O duodeno foi fixado em formaldeído a 4%, e encaminhado para processo histológico. Coloração em HE (X100). Escala: 25µm.

4.5 Avaliação morfométrica da altura dos vilos nos animais desafiados com 5-FU (150mg/kg) e tratados com salina.

O desafio pelo 5-FU nos camundongos diminuiu significativamente ($p < 0.001$) a altura dos vilos em comparação com o grupo controle. Essa diminuição foi mais evidente no duodeno. (Figura 15).

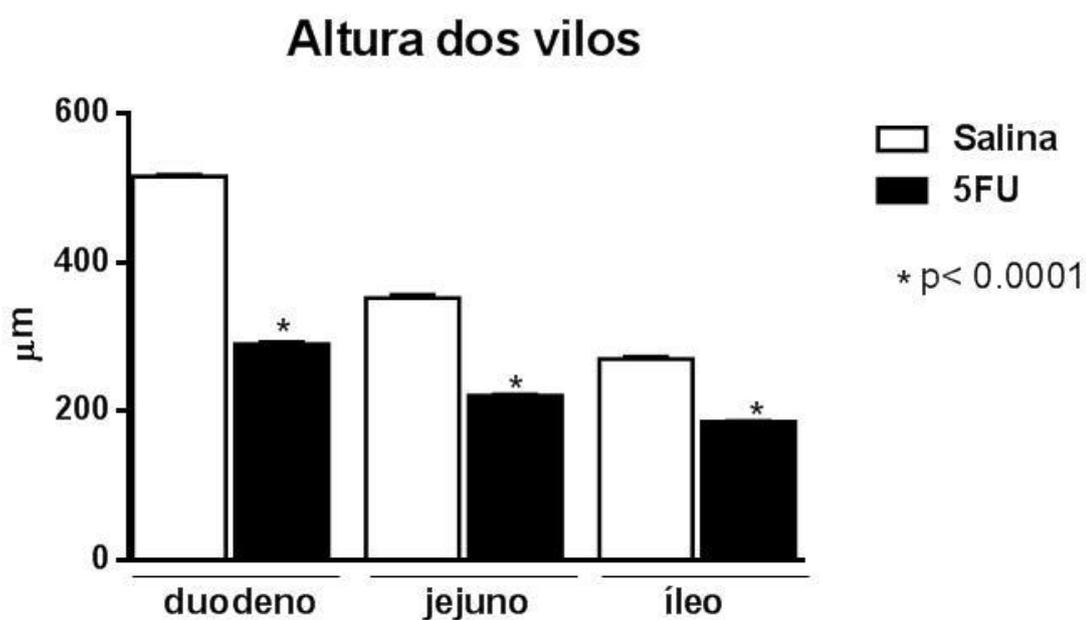


Figura 15: Avaliação morfométrica da altura dos vilos no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos desafiados pelo 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0.001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 4.

4.6 Avaliação morfométrica da profundidade das criptas nos animais desafiados com 5-FU (150mg/kg) e tratados com salina.

O desafio pelo 5-FU nos camundongos aumentou significativamente ($p < 0.001$) a profundidade das criptas em comparação com o grupo controle. Esse aumento foi mais evidente no duodeno. (Figura 16).

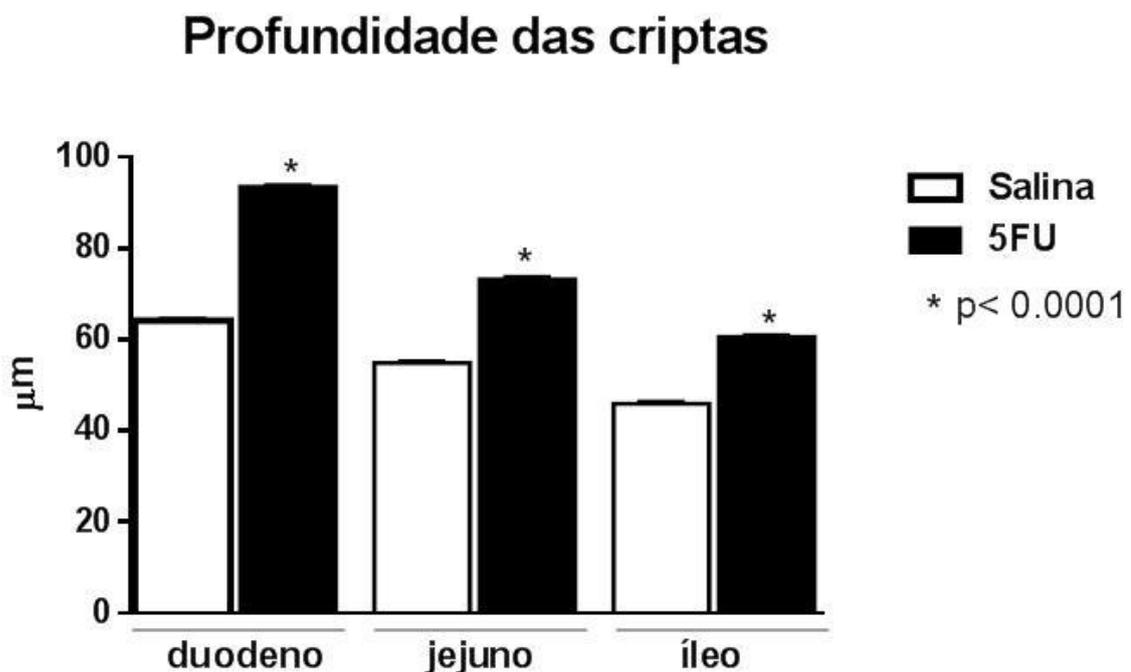


Figura 16: Avaliação morfométrica da profundidade das criptas no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos desafiados pelo 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0.001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 4.

4.7 Avaliação morfológica da razão vilosidade/cripta nos animais desafiados com 5-FU (150mg/kg) e tratados com salina.

O desafio pelo 5-FU nos camundongos diminuiu significativamente ($p < 0.001$) a razão vilosidade/cripta em comparação com o grupo controle. Essa diminuição foi mais evidente no duodeno. (Figura 17).

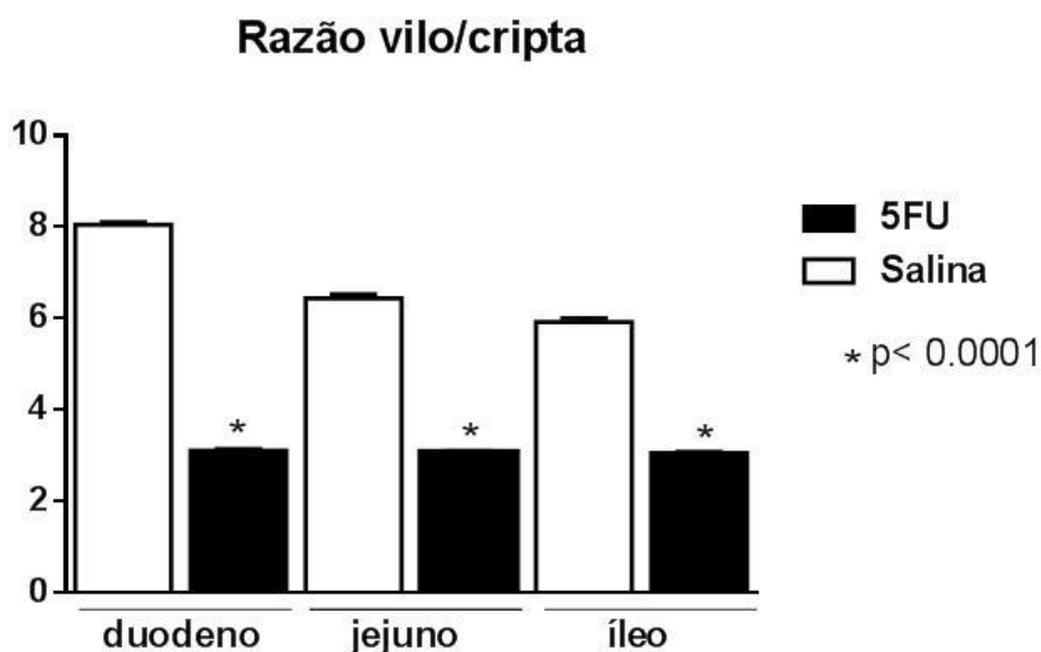


Figura 17: Avaliação morfológica da razão vilosidade/cripta no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos desafiados pelo 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0.001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.8 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO foi observada no grupo 5-FU em todos os segmentos do intestino delgado (Figura 18), sendo que o aumento da atividade da enzima foi mais significativo no duodeno.

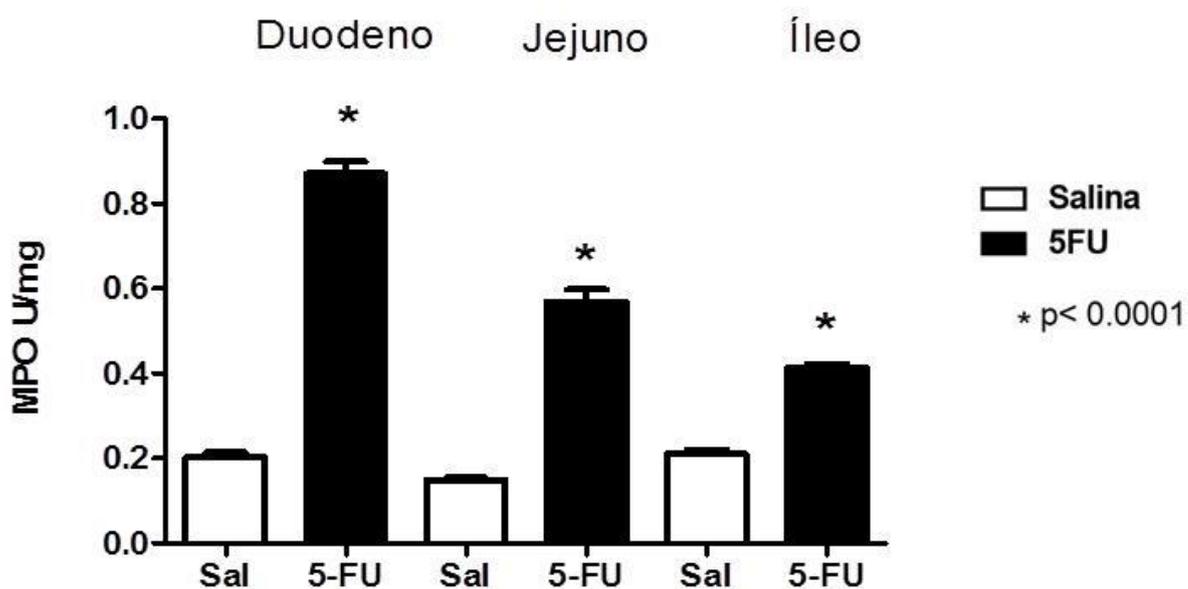


Figura 18: Avaliação da atividade de MPO no duodeno, jejuno e íleo três dias após o tratamento com salina ou 5-FU. Animais tratados com 150mg/kg de peso de solução salina ou 5-FU por via intraperitoneal. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0.001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.9 Avaliação da frequência de células NK no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) diminuiu significativamente ($p < 0,002$) o percentual de células NK no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. (Figura 19).

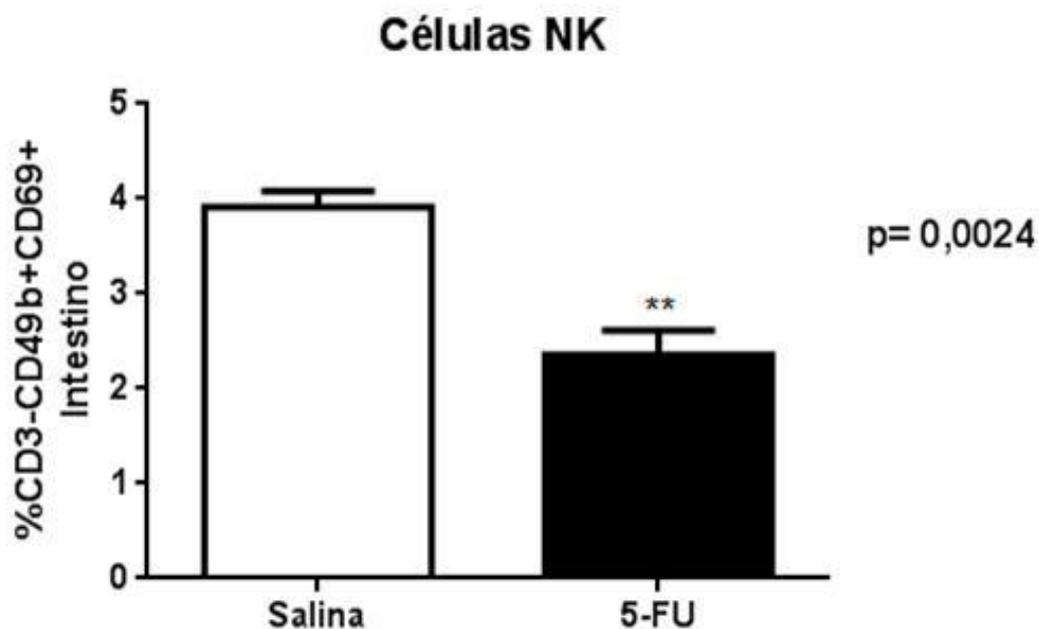


Figura 19: Frequência de células NK no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.10 Avaliação da frequência de células NK CD16+ no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) diminuiu significativamente ($p < 0,004$) o percentual de células NK CD16+ no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. As células NK que estão diminuídas no grupo 5-FU são classificadas como CD16+. (Figura 20).

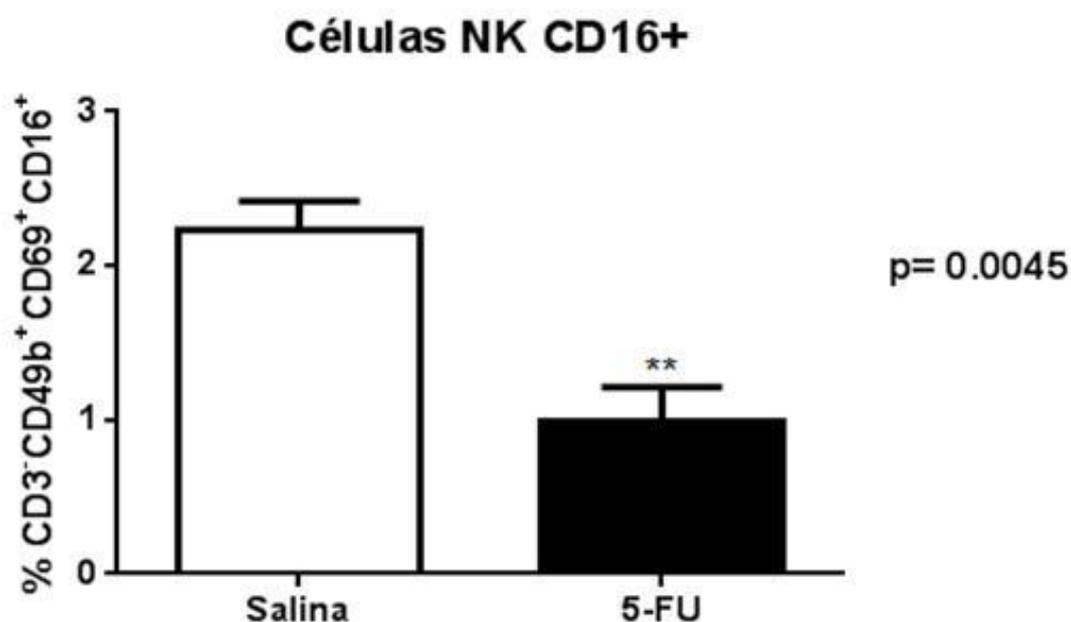


Figura 20: Percentagem de células NK CD16+ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.11 Avaliação da frequência de células NK CD16⁻ no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) diminuiu significativamente ($p < 0,002$) a frequência de células NK no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. As células NK que estão diminuídas no grupo 5-FU são classificadas como CD16⁺, já que quando analisada para CD16⁻ não houve significância ($p = 0,25$). (Figura 21).

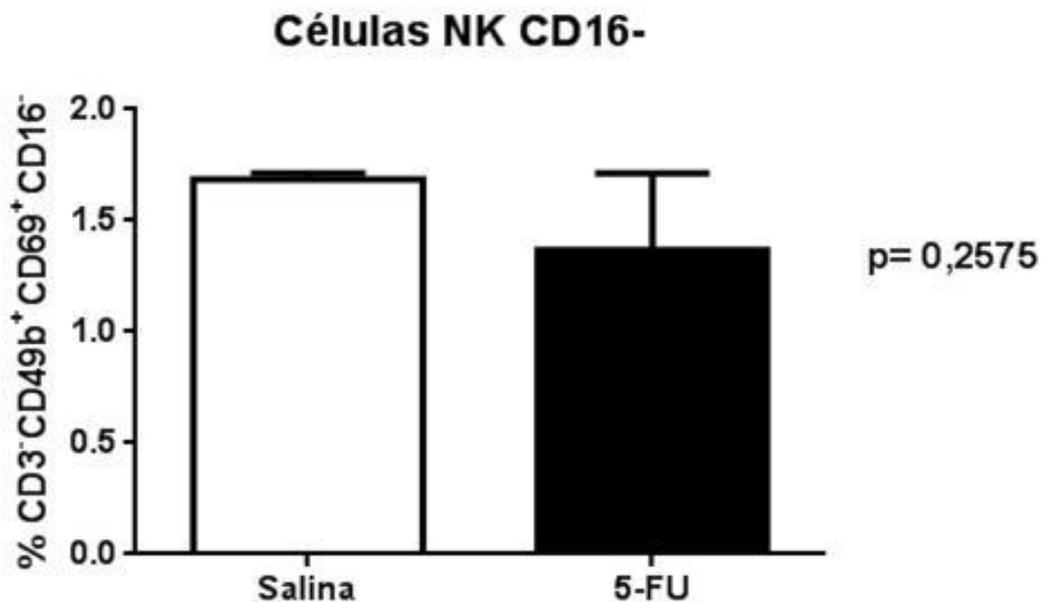


Figura 21: Frequência de células NK CD16⁻ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.

4.12 Avaliação da frequência de células NKT no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) aumentou significativamente ($p < 0,004$) a frequência de células NKT no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. (Figura 22).

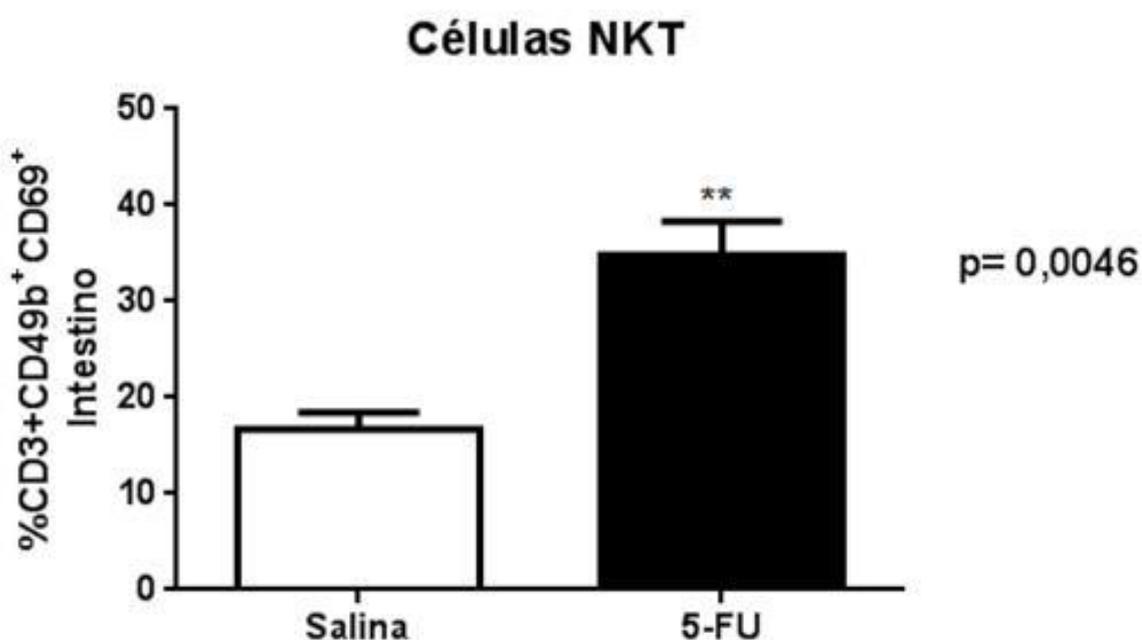


Figura 22: Frequência de células NKT no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,004$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.13 Avaliação da frequência de células NKT CD16+ no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) aumentou significativamente ($p < 0,001$) a frequência de células NKT CD16+ no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. (Figura 23).

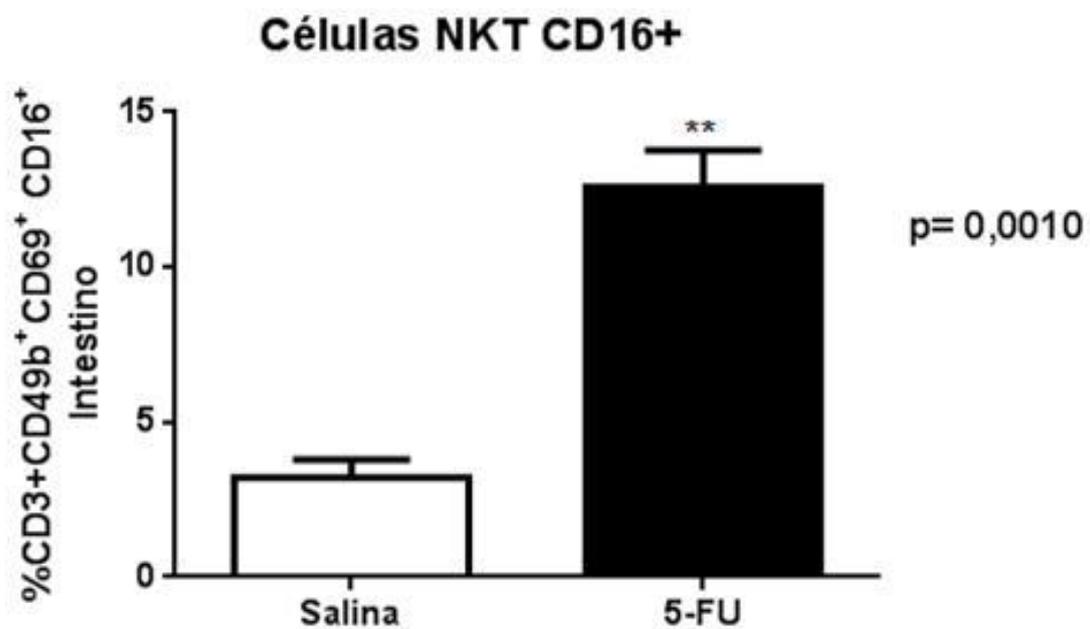


Figura 23: Frequência de células NKT CD16+ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.14 Avaliação da frequência de células NKT CD16- no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) aumentou significativamente ($p < 0,004$) a frequência de células NKT CD16- no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. As células NK que estão diminuídas no grupo 5-FU são classificadas como CD16+, já que quando analisada para CD16- não houve significância ($p = 0,18$) (Figura 24).

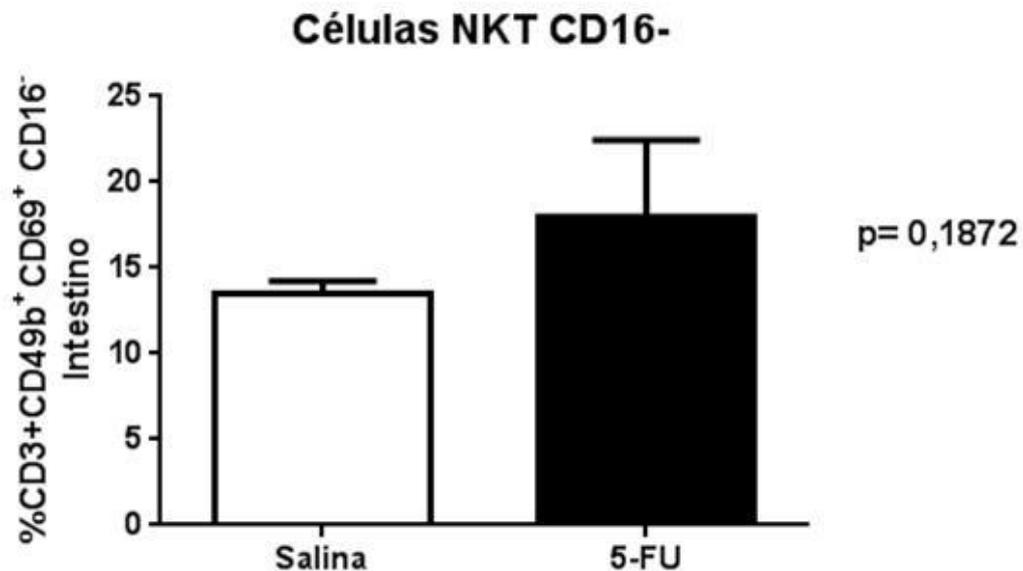


Figura 24: Frequência de células NKT CD16- no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU.

4.15 Avaliação da frequência de células CD3+CD4+ no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) diminuiu significativamente ($p < 0,001$) a frequência de células CD3+CD4+ no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. (Figura 25).

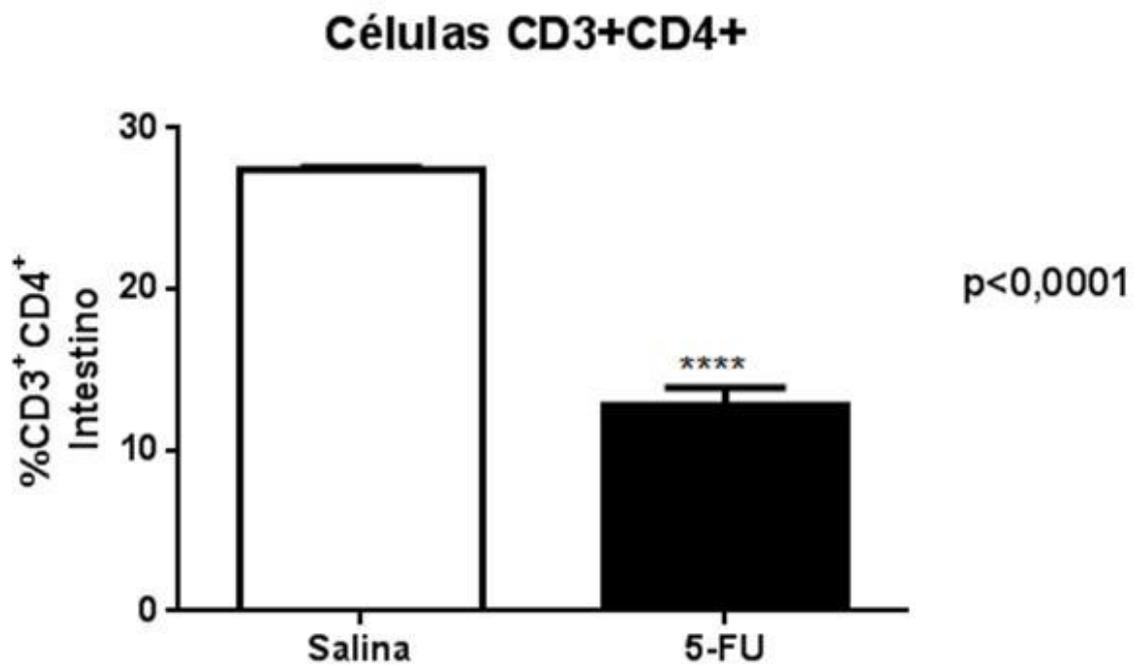


Figura 25: Frequência de células CD3+CD4+ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.16 Avaliação da frequência de células CD3+CD8+ no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) aumentou significativamente ($p < 0,001$) a frequência de células CD3+CD8+ no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. (Figura 26).

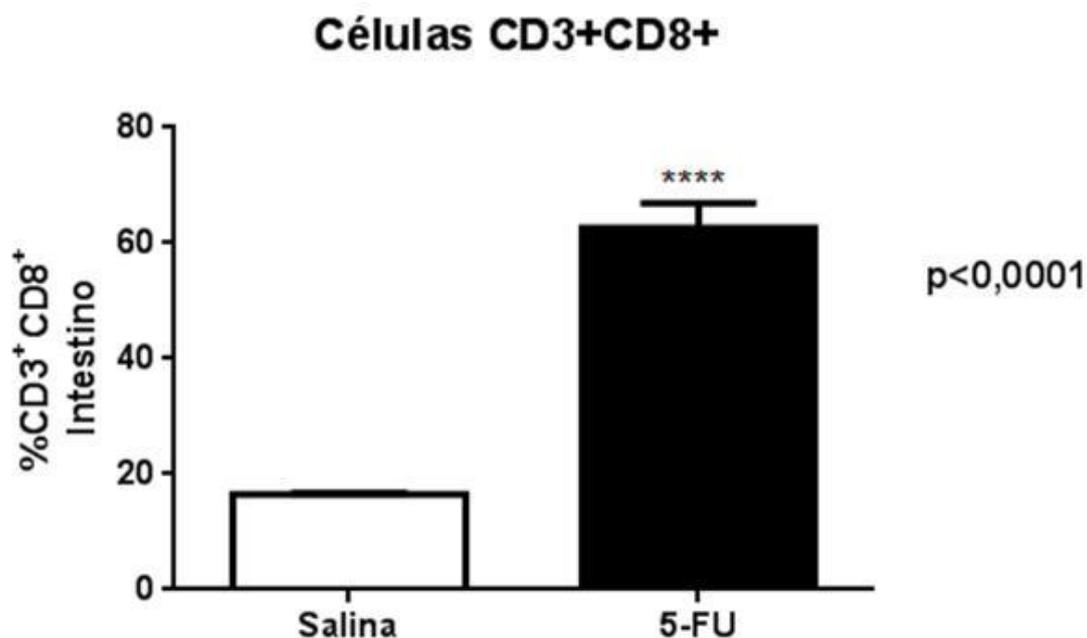


Figura 26: Frequência de células CD3+CD8+ no intestino delgado de camundongos desafiados por 5-FU. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.17 Avaliação da relação entre as frequências de células TCD4 e TCD8 no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

A relação entre as frequências de células TCD4/TCD8 é um parâmetro utilizado na clínica que se correlaciona com a imunidade do indivíduo. Uma redução nesse parâmetro é sugestivo de pior prognóstico em várias patologias. No nosso estudo, observamos uma intensa redução na razão de células TCD4/TCD8 naqueles camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU, quando comparado aos animais que receberam apenas salina como veículo ($0,2 \pm 0,5$ vs $1,6 \pm 0,6$, respectivamente. $p < 0,0001$).

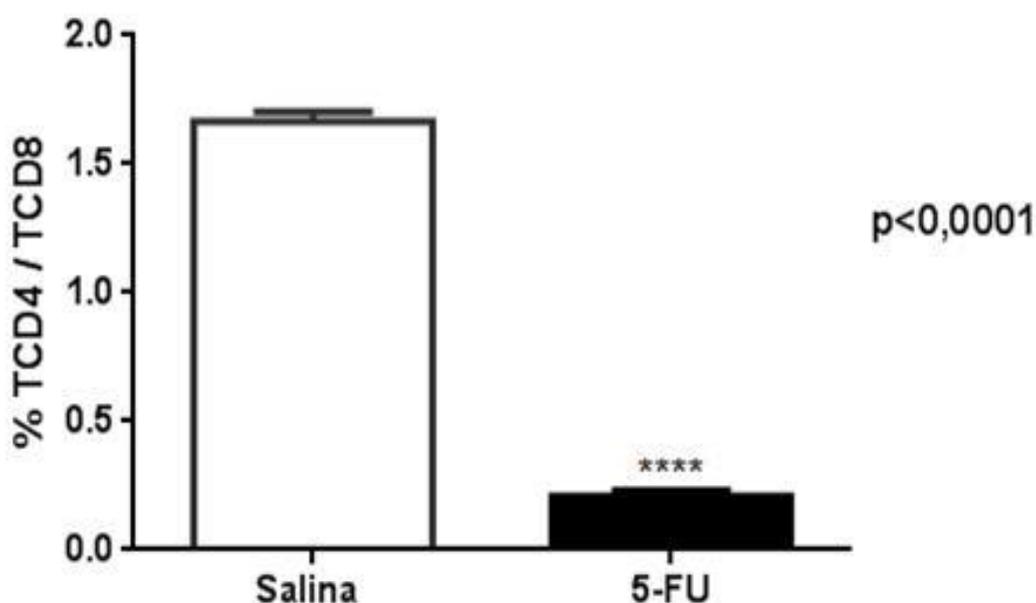
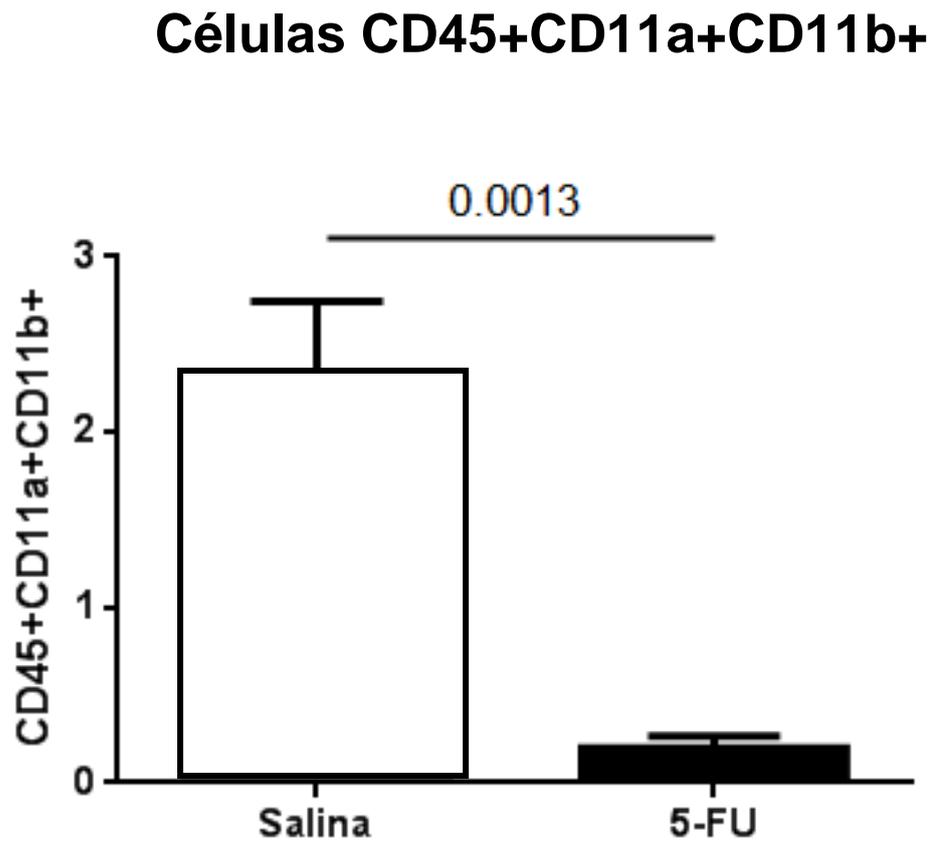


Figura 27: Razão entre as frequências de células TCD4⁺/TCD8⁺ na lâmina própria do intestino delgado de camundongos que receberam 5-FU ou salina. Os animais receberam 5-FU (150mg/kg, via i.p, dose única) ou solução salina e foram sacrificados com 72 horas. Os valores foram expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,001$ pelo teste não pareado *T de Student*. Número de amostras por grupo igual a 6.

4.18 Avaliação da frequência de células CD45+CD11a+CD11b+ no intestino delgado de camundongos C57BL/6J tratados com salina e 5-FU.

O desafio pelo 5-FU (150mg/kg) diminuiu significativamente ($p < 0,001$) a frequência de células CD45+CD11a+CD11b+ no intestino de camundongos C57BL/6J em relação ao grupo tratado com solução salina. (Figura 28).



5. DISCUSSÃO

O 5-FU é um dos quimioterápicos mais utilizados, principalmente para o tratamento de câncer de cólon. Seus efeitos colaterais são muito frequentes, levando muitas vezes a interrupção do tratamento (CHANG *et al.*, 2012). Devido a rápida regeneração que o epitélio intestinal sofre (cerca de 3-4 dias), isso o torna mais vulnerável a lesões ocasionadas por quimioterápicos, entre elas a mucosite. Os efeitos tóxicos provenientes da quimioterapia nas células da camada basal, ocasionam uma perda da capacidade de regeneração tecidual, resultando em morte celular, adelgaçamento mural e consequente ulceração (SONIS *et al.*, 2004).

A mucosite intestinal é um efeito colateral recorrente em pacientes que fazem uso do quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), chegando a acometer entre 40% e 100% desses pacientes, contribuindo para a interrupção do tratamento, necessidade de modificação no esquema de administração da droga, mudança na seleção do quimioterápico ou redução das doses, comprometendo a eficácia da terapia proposta, refletindo assim na saúde e na qualidade de vida do paciente (LEITÃO *et al.*, 2007; STRINGER *et al.*, 2009; VLIET *et al.*, 2010).

Nossos dados mostram que a toxicidade proveniente da administração do 5-FU foi observada nos camundongos C57BL/6J com a dose de 150mg/kg de peso por via intraperitoneal, como anteriormente relatado por Carneiro *et al.* (2004), sendo este estudo realizado em camundongos BALB/c. Os efeitos da administração de 5-FU em modelos animais são citados na literatura, como a redução do consumo alimentar (FERREIRA *et al.*, 2012) e a perda de peso (SOARES *et al.*, 2008; LINDSAY *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012). Ocorre também alterações na barreira intestinal, essa mudança pode se apresentar de diversas maneiras incluindo reações inflamatórias, ruptura da barreira epitelial intestinal e translocação bacteriana (DUNCAN *et al.*, 2003).

O 5-FU induz a perda de peso em camundongos por causar lesões intestinais e alterações sistêmicas. Como mostram os estudos feitos por Wu *et al.*, (2011), camundongos desafiados pelo 5-FU (200 mg/kg, i.p., dose única) desenvolveram desidratação, anorexia e exibiram 20% de perda de peso após seis dias da administração. No presente estudo e corroborando com Ferreira *et al.*, (2012), observou-se uma perda de

peso no grupo 5-FU após a indução da mucosite, sugere-se que essa redução seja devido ao prejuízo na absorção de nutrientes promovido pela redução da superfície de absorção e presença de ulcerações.

Soares *et al.*, (2008) e Han *et al.*, (2011) observaram que as alterações da mucosa são percebidas com maior intensidade a partir do 3º dia após o tratamento com o fármaco, e que a partir do 5º dia há recuperação da mucosa. A eutanásia no terceiro dia após a indução da mucosite parece ser, portanto, ideal para a avaliação dos efeitos do 5-FU na mucosa, como foi realizado no presente estudo.

No nosso trabalho encontramos uma diminuição significativa na quantidade de leucócitos nos animais desafiados com o 5-FU, o mesmo observado por outros autores (SONIS *et al.*, 1990; HAN *et al.*, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2012; VIANA *et al.* 2014). Provavelmente isso se deve à mielossupressão induzida pelo agente quimioterápico, comprovando sua atividade citotóxica e mielotóxica. Porém é importante ressaltar que nos outros estudos, o volume da dose foi diferente e o dia da eutanásia também, com exceção de Azevedo *et al.*, (2012) no qual a eutanásia dos animais também foi no terceiro dia de tratamento.

O infiltrado neutrofilico foi observado em diversos trabalhos que avaliaram a mucosite, como os de Azevedo *et al.*, (2012) e Ferreira *et al.*, (2012). No presente estudo, no grupo 5-FU, o infiltrado de neutrófilos, medido pela atividade de MPO, foi mais evidente no duodeno seguindo pelo jejuno e íleo, respectivamente. Diferente do nosso estudo, Lindsay *et al.*, (2010), avaliaram a atividade de mieloperoxidase em ratas com mucosite induzida por 5-FU e observou um aumento da atividade da enzima no jejuno, porém não no íleo.

Soares *et al.*, (2012) demonstraram que camundongos tratados com 5-FU com dose de 450 mg/kg, via intraperitoneal em dose única e sacrificados após três dias, apresentaram uma redução significativa dos vilos do duodeno com aumento da profundidade das criptas e uma diminuição da razão vilo/cripta. Em outro trabalho do mesmo autor, (2008), ratos desafiados pelo 5-FU foram avaliados nos dias 1, 3, 5, 15 e 30, apresentaram leucopenia, infiltração de células inflamatórias, encurtamento dos vilos e destruição das criptas no duodeno no terceiro dia após desafio com 5-FU.

Nossos resultados são análogos aos publicados na literatura no que tange aos

danos causados pela terapia com o 5-FU. No presente trabalho, os animais desafiados pelo 5-FU (150 mg/kg, intraperitoneal, dose única, eutanasiados no terceiro dia) apresentaram redução dos vilos, da razão vilo/cripta e um aumento da profundidade das criptas em todas as porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo).

Ao procurar identificar e caracterizar as populações de linfócitos NK, NKT, T CD4⁺ e T CD8⁺ na lâmina própria de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU, esperávamos sugerir um possível papel dessas células na patogênese na mucosite intestinal, com a possibilidade de investigação de novos alvos terapêuticos no futuro.

Observamos uma menor frequência de células NK na lamina própria intestinal dos camundongos com mucosite induzida por 5-FU, quando comparados aos animais que receberam apenas salina como veículo, com um decréscimo de quase 50% na frequência dessas células. Ao subdividirmos as células NK de acordo com a expressão da molécula CD16, observamos que essa redução observada no grupo 5-FU era relativa àquelas células NK CD16⁺, não havendo alteração na frequência das células NK CD16⁻.

A participação das células NK na patogênese de doenças inflamatórias intestinais não está claramente elucidada na literatura, com achados discrepantes a depender do estudo. Gopalakrishnan *et al.*, 2012, avaliaram o papel de prebióticos na colite experimental em murinos. Nesse estudo, os prebióticos utilizados reduziram a gravidade da colite, fato associado ao aumento significativo das células NK no baço e linfonodos mesentéricos. Além disso observaram o aumento da expressão de CCR9 nas células NK, receptor de quimiocina envolvido no *homing* dos linfócitos ao intestino. Contrariamente, em outro modelo de colite experimental induzido por micobacéria em camundongos IL-10-nocautes, as células NK estiveram relacionadas com o recrutamento e ativação de leucócitos CXCR3⁺ e CXCL11⁺ ao intestino, fato ligado ao agravamento da colite em hospedeiros susceptíveis (SINGH *et al.*, 2008).

As células NK, além do seu papel pró-inflamatório e antimicrobiano, podem, a depender do seu fenótipo, exercer função regulatória, suprimindo outras células do sistema imune e induzindo apoptose de células T CD4⁺. Em um modelo de colite experimental induzida pela transferência de células T CD4⁺ IL-10^{-/-}, a depleção de células NK acelerou o desenvolvimento da doença, a despeito do esperado pelos autores. A hipótese inicial era que a deleção dessas células melhorasse a inflamação, uma vez o IFN- γ produzido por essas células poderia contribuir para o desenvolvimento da colite.

Entretanto, as células NK tiveram efeito supressor *in vitro* sobre células CD4⁺CD45RB^{high}, efeito este dependente de perforina (FORT *et al.*, 1998). Yamaji *et al.*, 2012, também observaram o papel protetor das células NK em um modelo de colite induzida pela transferência de célula T, onde a depleção de células NKs induziu o aumento de células CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ colitogênicas.

Os nossos resultados não permitem afirmar o papel funcional das células NK que mensuramos na lâmina própria dos camundongos. Para tal seria necessário a modulação positiva ou negativa na frequência dessas células, a avaliação da atividade supressora/citotóxica *in vitro*, ou a detecção de citocinas intracelulares em experimentos futuros. Entretanto, ao nosso conhecimento, nenhum estudo anterior ao nosso avaliou a participação das células NK na mucosite intestinal induzida por 5-FU. As informações obtidas sobre o perfil de expressão dessas células nesse modelo são úteis para investigações futuras acerca do seu papel na patogênese da mucosite.

Contrariamente à redução de células NK, observamos um aumento na frequência de células NKT, especialmente àquelas CD16⁺, na lâmina própria intestinal dos camundongos desafiados com 5-FU. As células NKT podem ter um papel protetor ou patogênico a depender da natureza do estímulo inflamatório. Zhu *et al.*, 2014, observaram o aumento na frequência de células NKT em pacientes com colite ulcerativa e também no modelo experimental de colite induzida por oxazolona, onde células Th2 desempenharam papel patogênico. Esse aumento esteve relacionado com a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiotaxia aumentada e maior dano intestinal. Outros autores já demonstraram que a colite ulcerativa está associada ao aumento de células NKT invariantes (tipo II) na lâmina própria, com a produção de IL-13, que desempenharia papel patogênico nesse modelo (CAMELO *et al.*, 2012; FUSS *et al.*, 2014).

Em discordância ao observado nos modelos de colite ulcerativa, as células NKT também podem desempenhar papel regulatório protetor em modelos de colite onde a resposta Th1 é patogênica. Hornung *et al.*, 2006, demonstraram que células NKT expressando DX5 (CD49b) são capazes de melhorar a colite induzida pela transferência de células CD4⁺CD62L⁺, assim como aquela induzida por dextran sulfato de sódio. Nesse estudo, as células NKT, ativadas via CD1d, induzem a apoptose de linfócitos colitogênicos através de PD-L1 (Programmed death-ligand 1). Kim *et al.*, 2013, também demonstraram o papel regulatório e protetor dessas células na colite experimental

induzida por dextran sulfato de sódio, onde células NKT invariantes foram capazes de evitar o desenvolvimento da colite por meio da produção de IL-9 e inibição da produção de IFN- γ e IL-17.

Em nosso estudo, as células NKT avaliadas também expressam a integrina CD49b, entretanto, não podemos afirmar, com os dados obtidos, que essas células estariam exercendo uma função regulatória na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Para tal, seria necessário a realização de ensaio funcional. Entretanto, de acordo com Stenström *et al.*, 2004, as células NKT murinas podem ser divididas em NKT1, que produzem altos níveis de IFN- γ após a estimulação, e NKT2, que produzem altos níveis de IL-4. Segundo esses autores, essas células seriam assim subdivididas de acordo com a expressão de CD49b e CD69. Células CD49b^{high} CD69⁻ seriam classificadas como NKT1I, enquanto que células CD49^{-low} CD69⁺ como NKT2. O perfil das células NKT, em todos os grupos dos animais avaliados no nosso estudo foi caracterizado pela expressão de baixos níveis da molécula CD49, e baixa a intermediária de CD69 (como podemos observar na figura 9 da seção 3.8.1 de materiais e métodos). Isso nos leva a formular a hipótese de que essas células NKT observadas na lâmina própria dos animais desafiados com 5-FU poderiam estar atuando de forma regulatória, na tentativa de controlar o processo inflamatório.

Com relação às subpopulações de células T, observamos uma redução na frequência de células CD4⁺ e um aumento expressivo na frequência de células CD8⁺ na lâmina própria dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Corroborando com os nossos dados, Nancey *et al.*, 2006, também encontraram maior frequência de células T CD8⁺ em camundongos com colite induzida por ácido sulfônico 2,4 dinitrobenzeno. Além disso, observaram que essas células exerciam atividade citotóxica sobre células epiteliais na lâmina própria por meio da produção de granzima B. A depleção das células T CD8, mas não de células T CD4 preveniu o desenvolvimento da colite. Os autores concluíram que a atividade citolítica das células T CD8 pode ser responsável pela iniciação do processo inflamatório nesse modelo.

Muller *et al.*, 1998, identificaram maior expressão de células T CD8 citotóxicas, expressando granzima A e perforina, na lâmina própria de pacientes com doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e colite ulcerativa. Funderburg *et al.*, 2013, também observaram o aumento na contagem de células T CD8, mas no sangue periférico,

dos pacientes com doença inflamatória intestinal quando comparado com os controles. Na colite espontânea experimental em camundongos nocautes para IL-10 e para TNFR2 ocorre a expansão de células T CD8. A depleção dessas células, por meio da administração de anti-CD8 previne a inflamação colônica.

Katayama *et al.*, 2014, ao estudar o papel da molécula adaptadora Ink (SH2B3) que participa da linfopoiese, demonstraram que animais nocautes para esse marcador apresentavam alto número de linfócitos TCD8 efetores ou de memória no intestino. Esse aumento de linfócitos T CD8 esteve associado à inflamação e encurtamento dos vilos intestinais.

Interessantemente, observamos uma redução expressiva da taxa TCD4/ TCD8 nos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU quando comparados ao grupo controle. Segundo Yin *et al.*, 2015, a taxa de células TCD4/TCD8 é utilizada como um índice clínico na avaliação da imunidade. De fato, essa é uma medida utilizada em muitas patologias e apresenta-se baixa em várias doenças infecciosas como sífilis (KANDA *et al.*, 1992), AIDS (SERRANO-VILLAR *et al.*, 2014) e tuberculose pulmonar (YIN *et al.*, 2015). Serrano-Villar *et al.*, 2014, demonstraram que uma taxa T CD4/ T CD8 reduzida em adultos infectados pelo vírus HIV está associada a várias anormalidades imunológicas, com ativação das células TCD8. Essas mudanças periféricas também repercutem no intestino, estando associadas a maior morbimortalidade dos pacientes. Com a evolução da AIDS e a queda nos níveis de TCD4, o número de células TCD8 aumenta, causando a queda na taxa CD4/CD8, o que é sugestivo de pior prognóstico. Os autores demonstram que nos pacientes com HIV a taxa TCD4/TCD8 é uma medida de menor variabilidade individual (coeficiente de variação) ao longo do tempo, do que as medidas de TCD4 e TCD8 isoladamente.

Seria interessante avaliarmos, em estudos futuros, se essa queda na taxa de células T CD4/CD8 observada na lâmina própria intestinal dos camundongos com mucosite por 5-FU também é vista no sangue periférico dos animais. Em caso positivo, estudos com sangue periférico dos pacientes em tratamento com 5-FU poderiam ser conduzidos a fim de avaliar se a queda nessa taxa está relacionada com o desenvolvimento da mucosite.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (150 mg/kg) causou redução do peso ponderal, leucopenia, redução na altura dos vilos, aumento da profundidade das criptas, redução da razão vilo/cripta nos animais quando comparados ao grupo controle. Analisando os três parâmetros da morfometria, observou-se que é mais significativo no duodeno, em relação ao jejuno e íleo.
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (150 mg/kg) causou um aumento da atividade de MPO em todos os segmentos do intestino delgado, sendo mais significativo no duodeno.
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (150 mg/kg) causou uma diminuição na frequência de células NK no intestino delgado dos animais, quando comparado aos animais do grupo controle. Sendo que ao analisar essa população linfocitária, observou-se que essas células eram células NK CD16+.
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (150 mg/kg) causou um aumento na frequência de células NKT no intestino delgado dos animais, quando comparados aos animais do grupo controle. Sendo que ao analisar essa população linfocitária, observou-se que essas células eram células NKT CD16+.
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (150 mg/kg) causou uma diminuição na frequência de células CD3+CD4+ e na frequência de células CD45+CD11a+CD11b+ no intestino delgado dos animais, quando comparados aos animais do grupo controle.
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (150 mg/kg) causou um aumento na frequência de células CD3+CD8+ no intestino delgado dos animais, quando comparados aos animais do grupo controle.

- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (150 mg/kg) causou uma redução na razão entre as frequências das células TCD4/TCD8 e das células CD45/CD11a/CD11b no intestino dos animais, quando comparados aos animais do grupo controle.

Acreditamos que estudos subsequentes nesta área, principalmente sobre o perfil funcional das células NK e NKT, bem como as alterações na relação entre as frequências de células T CD4 e CD8, podem ajudar na compreensão dos mecanismos que geram da mucosite intestinal induzida por 5-FU, visando os benefícios para os pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKATSUKA, S.; YAMASHITA, Y.; OHARA, H.; LIU, Y.T.; IZUMIYA, M.; ABE, K.; OCHIAI, M.; JIANG, L.; NAGAI, H.; OKAZAKI, Y.; MURAKAMI, H.; SEKIDO, Y.; ARAI, E.; KANAI, Y.; HINO, O.; TAKAHASHI, T.; NAKAGAMA, H.; TOYOKUNI, S. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. *PLoS. One.*, v.7, p.e43403-2012.

ANELLI, A. Tratamento sistêmico do câncer. In: KOWASLKI, L.P.; ANELLI, A.; SALVAJOLI, J.V; LOPES, L.F. Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia. 2ª ed. São Paulo: Âmbito Editores Ltda, 2002. p.100-111.

ANTUNIASSI, A. R. Ocorrência e grau de severidade da mucosite bucal em relação ao fluxo salivar de pacientes sob quimioterapia. Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2005. 62p.

ARREBERG P., HALDER R., KUMAR V. (2009). Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol.* 218:246-250.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.*, v.8, p.411-420,2008.

AZEVEDO, O.G.; OLIVEIRA, R.A.; OLIVEIRA, B.C.; ZAJA-MILATOVIC, S.; ARAUJO, C.V.; WONG, D.V.; COSTA, T.B.; LUCENA, H.B.; LIMA, R.C., Jr.; RIBEIRO, R.A.; WARREN, C.A.; LIMA, A.A.; VITEK, M.P.; GUERRANT, R.L.; ORIA, R.B. Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. *BMC. Gastroenterol.*, v.12, p.35-2012.

BASKAR, R.; LEE, K.A.; YEO, R.; YEOH, K.W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J. Med. Sci.*, v.9, p.193-199,2012.

BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J.; CUMMINS, A.G.; KEEFE, D.M.K. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer*, v.14, p.713-731, 2006.

BREDA, M. ; BARATTE, S. A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.397, p.1191-1201,2010.

BROSSAY L., CHIODA M., BURDIN N., KOEZUKA Y., CASAROTI G., et al. CD1d-mediated recognition of an galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J. Exp. Med.* 188:1521-28,1998.

BENDELAC A., SAVAGE P.B, and TEYTON L. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 297-336, 2004.

BERZINS S.P., KYPARISSOUDIS K., PELICCI D.G., HAMMOND K.J., KRONENBERG M. Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for human studies. *Immunol Cell Biol* 82:247-252.

BRAZIL S., GURBUZ, A. T.; KUNZELMAN, J.; RATZER, E. E. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. *Journal of Surgical Research*, v.74, p.149–154, 2013.

BRIGL M., BRENNER M.B. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22:817-90. 2004.

BOROWSKI C., CAMILLERI, M.; MADSEN, K.; SPILLER, R.; VAN MEERVELD, B. G.; VERNE, G. N. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil*, v.24, p.503-512, 2005.

CAMELO, T., et al. Chemotherapy-induced mucositis is associated with changes in proteolytic pathways. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.), v.233, p.219-228,2012.

COLONNA D., LOGAN, R.M.; STRINGER, A.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.; GIBSON, R.J.; SONIS, S.T.; KEEFE, D.M. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat. Rev.*, v.33, p.448-460,2011.

COURSIER, S.; MARTELET, S.; GUILLERMET, A.; EMPTOZ, J.; VILLIER, C.; BONTEMPS, H. [Severe toxicity following capecitabine administration because of

dihydropyrimidine deshydrogenase (DPD) deficiency]. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, v.34, p.218-223,2010.

CERF-BENSUSSAN N., GABORIAU-ROUTHIAU V., The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.*, v.186, p. 1531-1537, 2010.

CHANG, C.-T.; HO, T.-Y.; LIN, H.; LIANG, J.-A.; HUANG, H.-C.; LI, C.-C.; LO, H.-Y.; WU, S.-L.; HUANG, Y.-F.; HSIANG, C.-Y. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-kB activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS ONE*, v.7, n.3, p.e31808, 2012.

CHU, E.; DeVITA, V.T.J. Principles of cancer management: chemotherapy. In: DeVITA, V.T.J.; HELLMANS, S; ROSEMBER, S.A. *Cancer: principles and practice of oncology*. 6^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.289-306, 2001.

CARVALHO K.I., MELO K.M., BRUNO F.R., KALLAS E.G.. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *Plos One*. Sep 9;5 (9). Pii: 12652, 2010.

CHIU Y.H., JAYAWARDENA J., WEISS A., LEE D., PARK S.H., et al. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J. Exp. Med.* 189: 103-10, 1999.

COFFMAN R.L. Origins of the T (H) 1 – T (H) 2 model: a personal perspective. *Nat. Immunol* 7 (6): 539-41, 2006.

CHEN N., McCARTHY C., CERUNDOLO V., et al. HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *Eur. J. Immunol* 36:278-286, 2007.

CRAIG T., STIZEL G.S., Probiotic factors partially prevent changes to caspases 3 and 7 activation and transepithelial electrical resistance in a model of 5-Fluorouracil-induced epithelial cell damage. *Support Care Cancer*, v.20, p.3205-3210, 2012.

DELAROSA O., TARAZONA R., CASADO J.G., ALONSO C., SOLANA R. Valpha24 NKT cells are decreased in elderly humans. *Exp. Gerontol* 37:213-7, 2002.

DUNCAN, M. ; GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.18, p.853-874,2003.

EBERL G., MACDONALD R. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 985-992, 2000.

EMOTO M., EMOTO Y., and KAUFMANN S.H.E. Induction of IFN-gama-producing CD4⁺ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. *Eur. J. Immunol.* 29(2):650-9, 1999.

FERREIRA, T. M.; LEONEL, A. J.; MELO, M. A.; SANTOS, R. R. G.; CARA, D. C.; CARDOSO, V. N.; CORREIA, M. I. T. D. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. *Lipids*, v.47, p.669–678, 2012.

FISCHER K., SCOLET E., KAUFMANN S.H., et al., Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:10685-10690. 2004.

FORT, B. et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat. Rev.*, v.33, p.448-460,1998.

FUNDERBURG, T., et al. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.*, v.8, p.435-446,2013.

FUSS I.J., et al., Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 113:1490-1497, 2004.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer*, v.14, p.890–900, 2006.

GIMENEZ, D.L. Quimioterapia. In: IKEMORI, E.H.A; OLIVEIRA, T; SERRALHEIRO, I.F.D.; SHIBUYA, E. COTRIM, T.H.; TRINTIN, L.A. et al. *Nutrição em oncologia*. 1ª ed. São Paulo: Lemar; 2003. p.179-88.

GREM, J. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Investigational New Drugs*, v.18, p.299–313, 2000.

GODFREY D.I., and KRONENBERG M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* 114(10):1379-88, 2004.

GOPALAKRISHNAN H.J et al., The effect on the small bowel of 5-FU and oxaliplatin in combination with radiation using a microcolony survival assay. *Radiation Oncology.*, v. 4, p.61, 2012.

HAN, D. ; WEINBERG, R.A et al., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, p.646-674,2011.

HAUER-JENSEN F., HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine*, v.28, n.10, p.1456–1462, 2004.

HORNUNG, L., et al. Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs. *Immunol. Rev.*, v.215, p.178-188,2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço.3ªed. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

JAHNG, W.Q.; FU, F.F.; LI, Y.X.; WANG, W.B.; WANG, H.H.; JIANG, H.P.; TENG, L.S. Molecular biomarkers of colorectal cancer: prognostic and predictive tools for clinical practice. *J. Zhejiang. Univ Sci. B*, v.13, p.663-675,2004.

JENSEN, S. B.; PEDERSEN, A. M.; REIBEL, J.; NAUNTOFTE, B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer*, v.11, n.4, p.199-200, 2003.

JUSTINO, S. V.; VIANA, M. L.; SANTOS, R. G.; ARANTES, R. M. E.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R.; MACHADO, J. A. N.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *Eur J Nutr*, v.50, p.261–269, 2014.

KATAYAMA, C., et al. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.*, v.3, p.984-993,2014.

KANDA, R., et al. Oesophageal cancer: new developments in systemic therapy. *Cancer Treat. Rev.*, v.29, p.525-532,1992.

KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. *Current Opinion in Oncology*,v.19, p.323–327, 2007.

KLEIN, A. Different mechanisms of mitotic instability in cancer cell lines. *Int J Oncol.*, p. 29, v. 1389-1396, 2006.

KLIJN, C.; HOLSTEGE, H.; DE, R.J.; LIU, X.; REINDERS, M.; JONKERS, J.; WESSELS, L. Identification of cancer genes using a statistical framework for multiexperiment analysis of nondiscretized array CGH data. *Nucleic Acids Res.*, v.36, p.e13-2008.

KUNISAWA J., KURASHIMA Y., KIYONO H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v.64, 523-30, 2012.

KUROSHIMA, L.; GUO, X.; RAO, J. N.; ZOU, T.-T.; XIAO, L.; YU, T.; TIMMONS, J. A.; TURNER, D. J.; WANG, J.-Y. Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v.296, p.C801-C810, 2013.

KINJO,Y.; WU, D.; KIM, G.; POLES, M.A., et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434 (7032):520-5,2005.

KIM, Y. et al. Monoclonal B cells detected in autologous PBSC grafts from patients with classical Hodgkin lymphoma: impact on relapse and survival following transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v.45, p.856-861,2013.

LALLA, R. V.; SHUBERT, M. M.; BENSADOUN, R. J.; KEEFE, D. Anti-inflammatory agents in the management of alimentary mucositis. *Support Care Cancer*, v.14, p.558–565, 2006.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A. L.; MACEDO, F. D. B.; SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. C. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-Fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.59, p.603–612, 2007.

LEVITT, P. S. Genome maintenance defects in cultured cells and mice following partial inactivation of the essential cell cycle checkpoint gene Hus1. *Mol Cell Biol.*, v.27, p. 2189-2201, 2007.

LIMA, V. de. Evidencias de participação de TNF- α e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-Fluorouracil e metotrexato em animais. Tese de doutorado. Fortaleza: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2004.

LINDSAY, L. et al. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol.*, v.3, p.1-11,2010.

LOPES, A. et al. Oncologia cirúrgica. In: KOWASLKI, L.P.; ANELLI, A.; SALVAJOLI, J.V; LOPES, L.F. Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia. 2ª ed. São Paulo: Âmbito Editores Ltda; 2002. p.81-91.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother Pharmacol*, v.63, p.239–251, 2009.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, v.3, p.330–338, 2003.

LIN H., NIEDA M., NICOL A.J. Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 t cells, NK cells, and B cells. *Exp. Hematol.* 34:289-295, 2006.

McCARTHY, G.M.; AWDE, J.D.; GHANDI, H.; VINCENT, M.; KOCHA, W.I. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-Fluorouracil. *Oral Oncol*, v.34, n.6, p.484-90, 1998.

MACIA, T.; MIYAZONO, Y.; ITO, K.; HAMADA, K.; SEKINE, S.; HORIE, T., et al. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.65, p.1117–1123, 2010.

MATSUDA J.L., NAIDENKO O.V., et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med* 192(5):741-54, 2000.

MARSH R.A., et al. Patients with X-linked lymphoproliferative disease due to BIRC4 mutation have normal invariant natural killer T cell populations. *Clin. Immunol* 132:116-123, 2009.

MATTNER J., DEBORD K.L., et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434:525-9, 2005.

MCDONALD, V.J. ; LORENZ, R.G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol.*, v.3, p.1-11,2003.

MONTOYA C.J., et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* 122:1=14, 2007.

MOODY D.B., ZAJONC D.M. and WILSON I.A. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nat. Rev. Immunol* 5:387-400, 2005.

MULLER, I. et al. Intestinal dendritic cells. *Adv. Immunol.*, v.107, p.109-138,1998.

NANCEY, F.R. et al. Promoter methylation and large intragenic rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. *BMC. Cancer*, v.10, p.470-2006.

NISS J.R., LANGKAMP-HENJEN, B. Arginine and immunity: a unique perspective. *Biomed Pharmacother*, v.56, p.471–482, 2005.

PAIVA, G.D. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev.*, v. 101, p. 3–9, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Quimioterapia do câncer. Em: *Farmacologia*, 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2004. p. 557-575.

ROSENFELD, R. S.; LEITE, C.; ROCHA, R. G. A. Terapia nutricional no paciente imunodeprimido e no câncer. Programa abbott de especialização em terapia intensiva. Rio de Janeiro: Vero Comunicação Total, v.10, p.03-12, 2001.

RUBESTEIN, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.*, v.24, p.147-174, 2004.

SANDBERG, J. S.; WYLLIE, A. H.; HENSON, J. E.; WALPORT, M. J.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest.*, v.83, n.3, p.865–875, 2004.

SALZMAN, N.H. Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.14, p.99-105, 2011.

SANTAOLALLA, R.; FUKATA, M.; ABREU, M.T. Innate immunity in the small intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, v.27, p.125-131, 2011.

SANTOS, T.C; BRAGA-NETO, M. B. et al. Alanyl-Glutamine and Glutamine Supplementation Improves 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Epithelium Damage in Vitro. *Dig Dis Sci*, v. 53, p. 2687-2696, 2009.

SATOH-TAKAYAMA, K.; SHITARA, Y.; SEKINE, S.; HORIE, T. Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.66, p.1031-1038, 2008.

SAVVA-BORDALO, J.; RAMALHO-CARVALHO, J.; PINHEIRO, M.; COSTA, V.L.; RODRIGUES, A.; DIAS, P.C.; VEIGA, I.; MACHADO, M.; TEIXEIRA, M.R.; HENRIQUE, R.; JERONIMO, C. Promoter methylation and large intragenic

rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. *BMC. Cancer*, v.10, p.470-2010.

SANSONETTI, R.A.; GONZALEZ, d., V; VISA, N. The incorporation of 5-fluorouracil into RNA affects the ribonucleolytic activity of the exosome subunit Rrp6. *Mol. Cancer Res.*, v.9, p.332-340,2004.

SARTOS, M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemotherapy Research and Practice*, v.2002, p.1-11, 2002.

SCULLY, M.; NIEVES JR, C.; LANGKAMP-HENJEN, B. Arginine and immunity: a unique perspective. *Biomed Pharmacother*, v.56, p.471–482, 2002.

SERRANO-VILLAR, D.P., et al. Activation-dependent proteolytic degradation of polymorphonuclear CD11b. *Br. J. Haematol.*, v.111, p.934-942,2014.

SHOD, D. M.; POTTEN, C. S.; HICKMAN, J. A. The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-Fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. *Cancer Res.*, v.58, p.5453-5465, 2012.

SHIMAMURA, S.; YANG, L.; HO, J.; SABRI, E.; MARTIN, L.; HALPENNY, M.; ATKINS, H.; SABLOFF, M.; MCDIARMID, S.A.; HUEBSCH, L.B.; BENCE-BRUCKLER, I.; GIULIVI, A.; ALLAN, D.S. Monoclonal B cells detected in autologous PBSC grafts from patients with classical Hodgkin lymphoma: impact on relapse and survival following transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v.45, p.856-861, 2001.

SINGH, K. et al., Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology*, v.135, p.529-538,2008.

SOARES, P. M. G.; MOTA, J. M. S. C.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; BRITO, G. A. C.; SANTOS, A. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Gastrointestinal dysmotility in 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.63, p.91–98, 2008.

SOARES, P. M. G.; MOTA, J. M. S. C.; SOUZA, E. P.; JUSTINO, P. F. C.; FRANCO, A. X.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Inflammatory intestinal damage induced by 5-Fluorouracil requires IL-4. *Cytokine*, v.61, p.46–49, 2011.

SONIS, S. T. The Pathobiology of mucositis. *Nature Reviews*, v.4, p.277-284, 2004.

SONG, J.M.; ROSSI, O.; MEIJERINK, M.; VAN, B.P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, v.108 Suppl 1, p.4607-4614,2011.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, S. J. A.; HAMILTON, J.; KEEFE, D. M. K. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Experimental Biology and Medicine*, v.234, p.430-441, 2009.

TEIXEIRA, L.A De uma doença desconhecida a um problema de saúde pública: INCA e o controle de câncer no país.2007

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_desconhecida_saude_publica.pdf

VANKAER, I.; BRENNAN, M. T.; SPIJKERVET, F. K. L.; LOGAN, R.; STRINGER, A.; RABER-DURLACHER, J. E.; KEEFE, D. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. *Support Care Cancer*, v.14, p. 519–527, 2007.

VERDE, S. M. M. L. Impacto do tratamento quimioterápico no estado nutricional e no comportamento alimentar de pacientes com neoplasia mamária e suas conseqüências na qualidade de vida. Dissertação de mestrado. São Paulo Faculdade de Saúde Pública da USP, 2007.

VLIET, M. J. van; HARMSSEN, H. J. M.; BONT, E. S. J.M. de; TISSING, W. J. E. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLOS Pathogens*, v.6, n.5, p.e.1000879, 2010.

VON BÜLTZINGSLÖWEN, I.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E.; DAHLÉN, G.; JONTELL, M. Oral and intestinal microflora in 5-Fluorouracil treated rats,

translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, v.18, n.5, p.278–284, 2003.

VAN DEN ELZEN, P.; GARG, S.; LEON, L.; BRIGL, M.; LEADBETTER, E.A.; GUMPERZ, J.E.; DASCHER, C.C.; CHENG, T.Y.; SACKS, F.M.; ILLARIONOV, P.A.; BESRA, G.S.; KENT, S.C.; MOODY, D.B.; BRENNER, M.B. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature*, v.437, p.906-910,2006.

WAGNER, K.R; CHIU, H.-D.; PENG, W.-H.; LIN, B.-R.; LU, K.-S.; LU, Y.-Z.; YU, L. C.-H. Epithelial inducible nitric oxide synthase causes bacterial translocation by impairment of enterocytic tight junctions via intracellular signals of Rho-associated kinase and protein kinase C zeta. *Crit Care Med*, v.39, p.2087–2098, 1998.

WU, Z. Q.; HAN, X. D.; WANG, Y.; YUAN, K. L.; JIN, Z. M.; DI, J. Z.; YAN, J.; PAN, Y.; ZHANG, P.; HUANG, X. Y.; WANG, Z. G.; ZHENG, Q. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-Fluorouracil chemotherapy model in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.68, p.87–96, 2011.

YAMAJI, K.Z.et al., Monoclonal B cells detected in autologous PBSC grafts from patients with classical Hodgkin lymphoma: impact on relapse and survival following transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v.45, p.856-861,2012.

YIN, G.S., et al. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflamm. Bowel. Dis.*, v.15, p.997-1006,2015.

YULING, E. J.; CUMMINS, A. G.; BUTLER, R. N.; PRISCIANDARO, L. D.; FAUSER, J. K.; YAZBECK, R.; LAWRENCE, A.; CHEAH, K. Y.; WRIGHT, T. H.; LYMN, K. A.; HOWARTH, G. S. Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 on intestinal mucositis induced by the chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil (5-FU). *Cancer Biology & Therapy*, v.8, n.6, p.505-511, 2009.

ZHANG, H; WU, L; WU. J. Cross-Talk between Apolipoprotein E and Cytokines. *Mediators of Inflamm.*, v. 2011, 2011.

ZHU, R. et al., Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, v.108 Suppl 1, p.4607-4614,2014.